

THESE

478

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

BRICOUT, FERNAND

Ancien Interne des Hôpitaux de PARIS

Né le 19 Avril 1928 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION À L'ETUDE DE

L'EFFET CYTO-PATHOGENE

DE LA

TOXINE DIPHTERIQUE

ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR R. TURPIN

TO THE HONORABLE SENATE OF THE UNITED STATES

IN SENATE, FEBRUARY 1, 1894

REPORT

OF THE

COMMISSIONERS OF THE GENERAL LAND OFFICE

IN RESPONSE TO A RESOLUTION PASSED BY THE SENATE

ON FEBRUARY 1, 1894

TO THE HONORABLE SENATE OF THE UNITED STATES

IN SENATE, FEBRUARY 1, 1894

THE PRESIDENT OF THE UNITED STATES

WASHINGTON, D. C.

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

BRICOUT, FERNAND

Ancien Interne des Hôpitaux de PARIS

Né le 19 Avril 1928 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION à L'ETUDE DE

L'EFFET CYTO-PATHOGENE

DE LA

TOXINE DIPHTERIQUE

ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR R. TURPIN



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. AUBIN (A.), BENARD (H.), BROCC (P.), BULLIARD (H.),
 CADENAT (F.), CHABROL (E.), CHAMPY (C.), CHEVALLIER (P.), DEBRE (R.),
 DONZELOT (E.), GASTINEL (P.), GUILLAIN (G.), HALPHEN (E.), HARVIER (P.),
 HAZARD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOL (P.), LAROCHE (G.), LAUBRY (C.),
 LEVY SOLAL (E.), LIAN (C.), LOEPER (M.), MARION (G.), MATHIEU (P.),
 MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.), OLIVIER (E.), PAS-
 TEUR VALLERY RADOT, PETIT-DUTAILLIS, RICHET (C.), STROHL (A.), TANON (L.).

DOYEN

L. BINET

Membre de l'Institut

ASSESEUR

Jean VERNE

I.- PROFESSEURS

MM.

Anatomie

" (Prof. à titre personnel)

Anatomie Pathologique

Anesthésiologie

Bactériologie

Biochimie médicale

" " (Prof. à titre personnel)

Biologie appliquée à l'Ed. Physique et aux Sports

Biologie médicale

" " (Prof. à titre personnel)

Cancérologie médicale et sociale

Clinique carcinologique chirurgicale

(Institut G. ROUSSY)

Clinique cardiologique (Broussais)

(Beaujon)

(Cochin)

Cliniques chirurgicales (Hôtel-Dieu)

(Saint-Antoine)

(Salpêtrière)

Clinique de chirurgie infantile et orthopédique

(Enfants Malades)

Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice

(Cochin)

CORDIER G.

DELMAS (A.)

DELARUE (J.)

BAUMANN (J.)

FASQUELLE (R.)

JAYLE (M.P.)

SCHAPIRA (G.)

CHAILLEY-BERT (P.)

FAUVERT (R.)

BOURLIERE (F.)

BERNARD (J.)

REDON (H.)

MOUQUIN (M.)

SICARD (A.)

QUENU (J.)

PATEL (J.)

GOSSET (J.)

MOULONGUET (P.)

FEVRE (M.)

MERLE d'AUBIGNE

Clinique de Chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	MM. GAUDART d'ALLAINES
Clinique de Chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enf. Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Cl. Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	ALAJOUANINE (T.)
(Bouciout)	LENEGRE (J.)
(Broussais)	SOULIE (P.)
Cliniques médicales (Cochin)	JUSTIN BESANCON
(Hôtel-Dieu)	BARIETY (M.)
(Pitié)	DREYFUS (G.)
(Saint Antoine)	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Richet)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	de GENNES (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
(Baudelocque)	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales (Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enf. Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (St Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin)	FEY (B.)
Embryologie	GIROUD (A.)

Histoire de la Médecine et de la Chirurgie
(Lariboisière)

MM. SEZE (S. de)

Histologie

VERNE (J.)

Hygiène et Clinique de la première enfance
(Trousseau)

TURPIN (R.)

Hygiène et Médecine préventive

JOANNON (P.)

Hygiène et Médecine préventive (Prof. à titre pers.)

DEPARIS (M.)

Médecine du travail

DESOILLE (M.)

Médecine légale

PIEDELIEVRE (R.)

Parasitologie

GALLIARD (H.)

Pathologie chirurgicale

COUVELAIRE (R.)

Pathologie exotique

LAVIER (G.)

Pathologie expérimentale et comparée

MERKLEN (F.P.)

Pathologie médicale

MILLIEZ (P.)

Pathologie et thérapeutique générales

GARCIN (R.)

Pharmacologie

CHEYMOL (J.)

" (Prof. à titre personnel)

LEVY (Mlle J.)

Physiologie

BINET (L.)

" (Prof. à titre personnel)

BARGETON (D.)

Physique médicale

DOGNON (A.)

" " (Prof. à titre personnel)

DJOURNO (A.)

Radiologie médicale

DESGREZ (M.)

Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale

LEGER (L.)

Thérapeutique

BROUET (G.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES

Anatomie

DABROL (C.)

COUINAUD (C.)

OLIVIER (G.)

Anatomie Pathologique

Mlle GAUTHIER-VILLARD (P.)

Pr. s. ch.

MM. BUSSE

GOUYGOU (Ch.)

ORCEL (L.)

PAILLAS (J.)

VOURC'H

Anesthésiologie

NEVOT (A.) Pr. s. ch.

Bactériologie

BARBIER (P.)

CHRISTOL (D.)

Biochimie médicale

DESGREZ (P.)

(Pr. s. ch.)

POLONOVSKI (J.)

M. conf.

Biologie appliquée à l'Ed.Physique et aux Sports
Carcinologie

Dermato-Syphiligraphie
Electro-Radiologie
Embryologie

Hématologie

Histologie

Hydrologie
Hygiène

Maladies infectieuses

Médecine Légale

Médecine du Travail
Neurologie
Obstétrique

Ophtalmologie

Orthopédie

Oto-rhino-laryngologie
Parasitologie

Pathologie Chirurgicale

MM.

PLAS (F.)
DENOIX (P.)
MATHE (G.)
DUPERRAT (B.)
LEDOUX-LEBARD (G.)
TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)

Pr. s. ch.
BILSKI-PASQUIER
DAUSSET (J.)
COUJARD (R.)

Pr. s. ch.
MAROIS (M.)
RACADOT (J.)
CORNET (A.)
BOYER (J.)

Pr. s. ch.
Mme CORRE-HURST (L.)
MM. BASTIN (R.)

DUPONT (V.)
DEROBERT (L.)
Pr. s. ch.
HADENGUE (A.)
FOURNIER (E.)
GUENIOT (M.)
ALBAHARY (C.)
LHERMITTE (F.)
GRANJON (A.)
HERVET (E.)
LE LORIER (G.)
MORIN (P.)
MUSSET (R.)
ROBEY (M.)

TROYER-ROZAT (J.)
BREGEAT (P.)
SARAUX (H.)
JUDET (R.)
RAMADIER (J.)
DEBAIN (J.)
BRUMPT (L.C.)
Pr. s. ch.
CHABAUD (A.)
BARCAT (J.)
BINET (J.P.)
CAUCHOIX (J.)
CHATELIN (C.L.)

Pathologie Chirurgicale

MM. DUBOST (Ch.)
DUBOST (Cl.)
FAUREL (J.)
FLABEAU (F.)
GERMAIN (A.)
LAURENCE (G.)
agr. per.
LORTAT-JACOB (J.L.)

Pathologie exotique

Pathologie expérimentale

LOYGUE (J.)
MERCADIER
PERROTIN (J.)
ROBERT (H.)
THOMERET (G.)
SCHNEIDER (J.)
CROSNIER (J.)
HARTMANN (L.)
LOEPER (J.)
MAURICE (J.)
RICHET (G.)

Pathologie médicale

AUSSANNAIRE (M.)
BOUR (H.)
BOUVIER (J.)
BRICAIRE (H.)
BRISSAUD (H.)
BROCARD (H.)
BUGE (A.)
CASTAIGNE (P.) M. Conf.
CATINAT (J.)
CONTAMIN (F.)
COURY (C.)
FREZAL (J.)
HOUSSET (E.)
LAROCHE (R.)
LESOBRE (R.)
MACREZ (C.)
NICK (J.)
PEQUIGNOT (H.) M. Conf.
ROYER (P.)
WOLFROMM (R.)
JOSEPH (R.)
MANDE (R.)
MOZZICONACCI (C.)
ROSSIER (A.)
BOISSIER (J.)
LECHAT (P.)

Pédiatrie - Puériculture

Pharmacologie

Physiologie

MM. PARROT (J.) Pr. s. ch.
DEJOURS (P.)

Physique médicale

GOIJEROT (L.) M. Conf.
Pr. s. ch.

Pneumo-Phtisiologie

KELLERSHOHN

Psychiatrie

KREIS (S.)

Psychiatrie infantile

PICHOT (P.)

Rhumatologie

DUCHÉ (D.)

Stomatologie

DELBARRE (F.)

CERNEA (P.)

Thérapeutique

MM. A. CHAPUT, M. Conf. Agr.
GRELLET (M.)

Urologie

MM. CHASSAGNE (P.)
LAMOTTE (M.)
QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE

CLINIQUE ANNEXE (à titre permanent)

Anatomie

MM. DEBEYRE

Clinique Chirurgicale

ABOULKER (P.)

MMELINE (A.)

(Pr. s. ch.)

HUGUIER (J.)

OLIVIER (C.)

PADOVANI (P.)

POILLEUX (F.)

ROUX (M.)

VERNE (J.M.)

BOUDIN (G.)

CONTE (M.)

DOMART (A.)

PERRAULT (M.)

RAMBERT (P.)

THIEFFRY (S.)

TURIAF (J.)

Clinique médicale

GRASSET (J.)

LEPAGE (F.)

MAYER (M.)

Clinique obstétricale

RAVINA (J.)

Clinique ophtalmologique

DESVIGNES (P.)

Clinique ophtalmologique	MM. OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)
Médecine légale	GAULTIER

IV - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES

ETRANGERES

Bactériologie	MM. HAUDUROY (P.)
	Pr. s. ch.
Biochimie médicale	ÉTTORI (J.)
	Pr. à t. pers.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.)
	Pr. s. ch.
Secrétaire Général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaires : Mme BEURLAND (H.), Melle CHAINTREUIL (G.) Melle HURE (A.)	
Conservateur en Chef	Monsieur le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Melles DUMAITRE (P.), GOICHON (A.M.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.)
	Melles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A la mémoire de mon PERE

Dont la bonté et la probité
seront toujours pour nous un modèle
de vie.

A ma MERE

Qu'elle trouve ici une modeste
preuve de mon affection et de ma
reconnaissance.

A ma FEMME

Que ceci lui témoigne de toute
mon affection.

A mes ENFANTS

A ma SOEUR

A mes FRERES

A mon ONCLE Jean-Pierre

A la mémoire de mon PARRAIN, le Docteur G. LARDENNOIS

A tous les miens

à notre Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur R. TURPIN

Médecin des Hôpitaux

qui nous a fait le grand
honneur d'accepter la présidence de
cette Thèse ;

qu'il trouve ici le témoignage
de notre reconnaissance pour l'enseignement
si fécond qu'il nous a prodigué.

A monsieur le Docteur REILLY

Chef du Laboratoire Central de l'Hôpital Claude Bernard

qui a bien voulu nous recevoir
dans son laboratoire afin d'y effectuer
ce travail ;

Qu'il nous permette de l'assurer
de notre profonde admiration et de
notre dévouement.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. TOURNIER,
Professeur Agrégé de Bactériologie

Qui a bien voulu nous confier ce travail
et nous a guidé de ses conseils avec
tant de patience,

Qu'il nous permette de l'assurer de notre
entière gratitude.

A MES MAITRES D'INTERNAT

A Monsieur le Professeur M. MOUQUIN

Professeur de Clinique cardiologique

Dont l'enseignement nous fut
si précieux,

En témoignage de notre profond
respect,

A Monsieur le Professeur L. MICHAUX

Professeur de clinique de Neuro-Psychiatrie infantile

qu'il veuille bien trouver ici
un témoignage de notre reconnaissance
pour son enseignement si profitable
et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Agrégé R. LAPLANE

Dont les qualités nous ont tant
séduit et dans le service duquel nous avons
pu travailler avec très grand profit;

qu'il trouve ici une bien
modeste preuve de notre admiration et
de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. CHASSAGNE

Dont la précision dans les
connaissances nous a toujours été d'une
si grande utilité ;

Qu'il veuille bien être assuré
de notre reconnaissance et de notre
dévouement.

A Monsieur le Professeur R. BASTIN

En témoignage de notre admiration
et de notre profond respect.

A Monsieur le Docteur J. MOUSSOIR

A qui nous devons tant et dont
nous avons toujours apprécié les qualités ;

Qu'il trouve ici un modeste
témoignage de toute notre reconnaissance
et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Docteur WORMS

Dont l'enseignement clinique
restera pour nous un modèle ;

Qu'il soit assuré de notre
gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur M. DEROT

Professeur de Clinique du Diabète

qui fut le premier à guider
nos pas dans la médecine et à qui nous
serons toujours reconnaissant pour la
fécondité de son enseignement ;

qu'il veuille bien trouver
ici un témoignage de notre fidélité et
de notre profond attachement.

A Monsieur le Professeur R. FASQUELLE

Professeur de Bactériologie

qui nous a toujours reçu avec
tant de cordialité et ne nous a pas
ménagé ses conseils ;

En témoignage de notre recon-
naissance et de toute notre admiration.

A Monsieur le Professeur R. RAYNAUD

Chef de Service à L'Institut Pasteur

qui nous a aidé avec tant de
bienveillance à la réalisation de ce
travail ;

En témoignage de notre vivo
gratitude et de notre profonde admiration.

A NOS MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

Monsieur le Professeur F.P. MERKLEN

Monsieur le Professeur J. HAMBURGER

Monsieur le Professeur Agrégé G. RICHEL

Monsieur le Professeur Agrégé CL. MACREZ

Monsieur le Docteur Gérard MARCHAND

Monsieur le Docteur Guy ALBOT

Monsieur le Docteur J. LAFOURCADE

Monsieur le Docteur P.Y. HATT

Monsieur le Professeur Agrégé D.J. DUCHE

A NOS MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

Monsieur le Professeur F.P. MERKLEN

Monsieur le Professeur J. HAMBURGER

Monsieur le Professeur Agrégé G. RICHEL

Monsieur le Professeur Agrégé CL. MACREZ

Monsieur le Docteur Gérard MARCHAND

Monsieur le Docteur Guy ALBOT

Monsieur le Docteur J. LAFOURCADE

Monsieur le Docteur P.Y. HATT

Monsieur le Professeur Agrégé D.J. DUCHÉ¹

A Monsieur le Professeur H. NEVOT

In Memoriam

A Monsieur le Professeur Agrégé P. BARBIER,

A Monsieur le Professeur Agrégé C. CHRISTOL,

Dont nous avons hautement apprécié l'enseignement
au Certificat d'Etudes spéciales de Bactériologie

En témoignage de notre gratitude
et de notre profond respect.

Tous nos remerciements vont à :

Madame JAILLARD

Madame MIRABEL

Mademoiselle ESTRADÉ

Mademoiselle TOULIER

Mademoiselle JOURET

pour leur collaboration technique
toujours si généreuse.

PLAN

- I.- Action cytotoxique de la toxine diphtérique.
 - II.- Action sur les cellules isolées en culture
 - a.- Méthodes et moyens d'études.
 - b.- Etude cytologique et morphologique
 - c.- Correspondance avec la peau du lapin,
 - d.- Cytologie en microscopie optique.
 - III.- Examen des cellules au microscope électronique :
 - 1.- les diverses cellules après l'action de la toxine,
 - 2.- les lésions observées,
 - 3.- les cellules protégées par l'entitoxine.
 - IV.- Examen des cellules de surrénales des cobayes intoxiqués au microscope électronique.
 - V.- Action antimitotique de la toxine diphtérique.
 - VI.- Interprétation de l'action de la toxine diphtérique :
 - a.- Toxinogénèse et prophage,
 - b.- Les travaux de PAPPENHEIMER
 - c.- Les travaux de STRAUSS, KATO et PAPPENHEIMER
 - d.- Apport de l'examen au microscope électronique des cellules intoxiquées.
 - e.- L'action antimitotique de la toxine diphtérique.
 - VII.- Applications pratiques.
 - VIII.- Conclusions.
-

L'ACTION CYTOTOXIQUE DE LA TOXINE DIPHTERIQUE

Depuis 1888-1890, date de la découverte par ROUX et YERSIN de la toxine diphtérique, on connaît son action létale. Injectée à forte dose à l'animal sensible, comme le lapin, le cobaye, elle provoque plus ou moins rapidement la mort de l'animal avec formation d'exsudat pleural, des lésions hépatiques et surtout d'une surrénalité hémorragique.

Mais la toxine diphtérique n'a pas seulement une action létale ; injectée à faible dose sous la peau, elle provoque chez l'animal d'expérience la formation d'un placard escarrotique, témoignage d'une action toxique locale.

Cette action toxique locale est utilisée depuis longtemps tant en clinique, au point de vue épidémiologique et comme test de réceptivité, qu'en pratique de laboratoire, car, en fait, ce n'est autre que la réaction de SCHICK qui est le moyen le plus simple pour juger du degré d'immunité d'un sujet vis-à-vis du bacille diphtérique ; en injectant, par voie intra-dermique, une dilution de toxine diphtérique telle que 1/10 de cc. contient 1/50 de la dose minima mortelle pour le cobaye, cette quantité de toxine diphtérique provoquera, chez le sujet réceptif, une réaction papuleuse 24 à 48 heures après l'injection ; cette réaction positive témoigne de la réceptivité du sujet vis-à-vis du bacille diphtérique, alors que le sujet immunisé, contenant des anticorps dans son sérum, ne fera aucune réaction, la toxine ayant été neutralisée par ses anticorps.

Cette sensibilité du sujet immunisé à l'action de la toxine diphtérique à faible dose a amené à utiliser cette réaction chez l'animal et à établir des corrélations avec la quantité injectée et la réaction cutanée obtenue.

En effet, si l'homme est sensible par voie intra-dermique à une dose de toxine correspondant au 1/500 de la dose mortelle pour le cobaye, un animal comme le lapin, également très sensible à l'action locale de la toxine diphtérique, fera une réaction érythémateuse pour des doses beaucoup plus faibles.

Et c'est ce qu'en pratique on a obtenu au moyen d'injection intra-dermique de toxine à la peau de lapin, ce qui a permis de mettre au point une méthode de dosage relativement simple, et paraissant très difèle, de cette toxine.

En effet, on pratique sur les flancs d'un lapin blanc préalablement tondu, une série d'intra-dermos réactions avec des dilutions croissantes de la toxine diphtérique que l'on désire titrer et on obtient ainsi, au bout de 48 heures, des papules érythémateuses d'un diamètre croissant avec le titre de la toxine, facilement mesurables ; le seul inconvénient vient de ce qu'avec une toxine peu diluée, on obtient un placard escharrotique, qui ne peut alors être mesuré avec précision. Par contre, des doses de toxine extrêmement faibles peuvent être détectées par cette méthode. N.K. JERNE, qui a décrit cette technique, fait, cependant, remarquer que des différences dans l'évaluation du placard peuvent intervenir selon l'individu qui fait les lectures.

A partir de cette réaction locale, à une dose donnée de toxine diphtérique, il est très facile de faire la correspondance avec la dose létale et cette méthode de titration est à différencier de celles qui consistent :

- . soit à inoculer une série de dilutions de toxine diphtérique à plusieurs cobayes, afin d'obtenir la mort de l'un d'eux;
- . soit à étudier la floculation initiale d'un mélange de toxine et d'antitoxine, décrite par G. RAMON.

En effet, la première technique demande d'avoir à sa disposition une série de cobayes.

Il faut injecter à cette série de cobayes d'un poids moyen de 250 g., sous le volume d'1 cc., des dilutions croissantes de la toxine que l'on veut titrer. C'est la dilution de toxine diphtérique qui aura provoqué la mort de l'animal en 96 heures qui pourra être considérée comme la dose minima mortelle.

Il suffit, connaissant une fois pour toutes le rapport existant entre une dilution de cette dose minima mortelle et la dimension de la plaque érythémateuse qu'elle provoque sous la peau du lapin, de comparer ensuite la taille des autres placards pour en déduire le titre d'une toxine inconnue.

Quant à la méthode décrite par RAMON, elle consiste à mettre en contact dans une série de tubes, une antitoxine connue de quantité fixe, et une toxine diphtérique dont le titre est inconnu ; la floculation initiale se produit alors dans le tube qui contient un nombre égal d'unités antitoxiques de sérum et d'unités antigènes de toxine ; connaissant le titre de l'antitoxine, il devient donc facile de faire le calcul du titre de la toxine diphtérique. Cette méthode a pour elle l'avantage considérable d'être rapide, obtenue en quelques heures. Cependant, elle ne mesure pas le pouvoir toxique, mais bien le pouvoir antigénique d'une toxine, et, par conséquent, est tout-à-fait différente des deux précédentes.

Cependant, il y a là un désagrément considérable : c'est qu'il n'y a pas de parallélisme entre les doses floculantes et les doses toxiques, de telle sorte qu'une toxine ayant encore un fort pouvoie floculant peut s'être déjà détoxiquée et avoir perdu tout ou partie de son pouvoir léthal pour l'animal.

ACTION DE LA TOXINE DIPHTERIQUE SUR LES CELLULES ISOLÉES EN CULTURE IN VITRO

Cette action locale de la toxine diphtérique avait déjà poussé LEVADITI et MUTERMILCH, au début de ce siècle, à étudier son action sur des cellules à l'état de vie prolongée in vitro.

En effet, en 1913, ils avaient communiqué à la Société de Biologie leurs résultats sur des cultures de fragments de cœur, de rein, de moëlle épinière cultivées en milieu de RINGER et sérum de poule. Ils avaient remarqué que :

- la toxine diphtérique empêche l'apparition des cellules fusiformes, c'est-à-dire la prolifération du tissu en culture : elle agit après une période d'incubation de 24 heures environ ; son chauffage à 100° pendant 15 minutes ne peut qu'atténuer son action cellulaire, le processus cellulaire redevenant normal au bout de 48 heures ; enfin, le sérum anti-diphtérique neutralise l'action de la toxine diphtérique, ce qui leur faisait conclure que l'antitoxine se fixe sur la cellule. Ils notaient encore qu'un fragment de cœur soumis à la toxine perdait pour toujours la propriété de se multiplier.

Ces travaux paraissaient dans l'oubli, lorsque l'ère des cultures cellulaires in vitro les a fait ressurgir.

En effet, depuis 1913, en dehors d'OKABE qui, en 1933, avait étudié également les possibilités de titrage d'une toxine diphtérique par des cultures de tissu, LASFARGUES et DELAUNAY, en 1940, avaient également fait des essais dans ce sens, sur des cultures d'embryon de cobaye.

Mais il faut attendre 1957 pour voir de nouvelles recherches dans ce sens. Plusieurs chercheurs s'y sont intéressé :

LENNOX et KAPLAN publient, en Juin 1957, les résultats de leur étude sur l'action de la toxine diphtérique vis-à-vis de divers types de cellules cultivées in vitro : ils montrèrent la sensibilité à la toxine des cellules de rein du lapin, du rein du singe et des cellules carcinomateuses d'origine humaine (HELA et HEP.) Un effet cytopathogène fut obtenu pour des dilutions variables selon le type de cellules en cause :

- 10^{-4} à 10^{-5} Lf/cc pour le rein de lapin ou le rein de singe,
- 10^{-3} Lf/cc pour les cellules Hela et Hep.

(une unité Lf étant définie comme le volume en cc. de toxine qui donne la floculation la plus rapide avec une unité standard d'antitoxine. A 1 Lf de toxine pure correspondent environ 15 doses léthales pour le cobaye).

Les cellules d'une lignée de cellules de rein de singe altérées par contre parurent insensibles à l'action de la toxine.

L'ensemble de leurs travaux leur a permis les conclusions suivantes :

- la réaction cytopathogène à la toxine diphtérique est spécifique puisque la toxine bouillie ou l'anatoxine sont sans effet sur la cellule ;
- la toxine est approximativement neutralisée à son titre par une antitoxine spécifique, à la condition que l'antitoxine soit ajoutée moins d'une heure après la mise en contact des cellules avec la toxine.

A la même époque, C. Plácido SOUSA et D.G. EVANS entreprirent les mêmes recherches ; ils eurent des résultats sensiblement identiques quant à la sensibilité des cellules en culture. Mais, en outre, ils comparèrent cette action cytopathogène à la réaction obtenue par injection sous la peau du cobaye de toxine diphtérique et leur conclusion fut que les deux tests montraient un ordre de sensibilité identique.

Ils complétèrent de travail par une étude du titrage d'une antitoxine en culture de cellules, en mélangeant celle-ci à leur toxine et en comparant l'effet cytopathogène obtenu avec une antitoxine standard.

Enfin, en Novembre 1957, G. MESSORE et A. CORACO publièrent les résultats de leurs recherches sur l'action des toxines diphtériques et tétaniques vis-à-vis de divers types de cellules cultivées in vitro, qui leur permettaient une conclusion analogue à celles de LENNOX et KAPLAN, et de Plácido SOUSA et EVANS.

La possibilité ainsi donnée d'avoir un moyen aisé de titrage d'une toxine diphtérique nous a donc incité :

- à étudier l'action cytotoxique de la toxine, en comparant cette action aux autres méthodes de dosage ;
- à essayer d'apporter quelques éléments sur l'interprétation de cette action cytopathogène ;
- à rechercher si l'on pouvait en pratique utiliser facilement une telle méthode.

A.- MÉTHODES ET MOYENS D'ETUDE

Méthodes

Pour arriver à ce résultat, nous avons étudié l'effet de la toxine diphtérique :

- sur divers types de cellules cultivées in vitro ;
- avec examen de ces cellules après coloration au microscope optique ;
- avec examen en microscopie électronique.

Nous avons également prélevé les surrénales de cobayes , à des temps variables, après inoculation de doses variables de toxine diphtérique, afin d'examen en microscopie optique et électronique.

Moyens d'Etudes

1.- LA TOXINE DIPHTERIQUE :

Plusieurs échantillons de toxine diphtérique nous furent très aimablement fournis par le Professeur RAYNAUD (Chef du Service de Biochimie bactérienne à l'Institut Pasteur de Paris).

Il s'agissait toujours d'une toxine purifiée contenue dans un tampon phosphaté, selon une technique décrite par le Professeur RAYNAUD.

Leur taux, en unités Lf, fut respectivement de :

2 500 Lf/cc

500 Lf/cc

750 Lf/cc

Bien que conservée dans son milieu, tamponnée, non diluée, à une température de -20° , la toxine diphtérique perd assez rapidement son pouvoir toxique, tout en conservant son titre flocculent. Ceci nous a conduit à surveiller très fréquemment ce pouvoir toxique par tests répétés à la peau du lapin. Nous n'avons dilué la toxine qu'au moment des expérimentations en ne la gardant à la température du laboratoire que le temps nécessaire aux dilutions et à l'inoculation.

D'autre part, nous avons recommencé les expériences avec un nouvel échantillon de toxine chaque fois que son pouvoir dermo-toxique avait manifestement baissé.

Pour étudier l'effet cytopathogène de cette toxine, nous avons, dans chaque expérience, fait les dilutions suivantes : 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} Lf/cc, dilutions effectuées sous le volume de 0,1 cc.

2.- LES LAPINS :

Les lapins utilisés pour tester la toxine furent des lapins blancs, n'ayant jamais été mis en contact avec des bacilles ou de la toxine diphtérique.

Pour chaque titrage, nous avons rasé les flancs des animaux à la tondeuse électrique, ce qui permet d'obtenir un rasage très fin, pratiquement aussi fin qu'avec un rasoir mécanique, mais irritant infiniment moins la peau de l'animal.

A chaque expérience, nous avons fait une série de six injections intradermiques de toxine, correspondant aux dilutions suivantes : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} Lf/cc.

toujours sous le volume de 0,1 cc.

3.- LES CELLULES CULTIVEES :

Nous avons fait notre expérience sur plusieurs types de cellules :

- cellules de rein de singe de primo-culture,
- cellules K.B. d'origine cancéreuse,
- cellules d'amnios,
- cellules de foie humain.

Toutes ces cellules étaient cultivées en milieu de Ly, qui est un hydrolysate de l'actalbumine, contenant des extraits de levure, et 10 % de sérum de veau maintenus à 37° .

Dès l'addition de toxine, les cellules furent examinées quotidiennement, pendant quatre jours.

La toxine fut ajoutée sous le volume de 0,1 cc. aux dilutions croissantes indiquées ci-dessus, dans des tubes de culture contenant 1 cc. de milieu.

Pour permettre la coloration des cellules, nous avons cultivé celles-ci sur des tubes à lamelle contenant 1cc.½ de milieu, et nous avons ajusté des dilutions de toxine à des chiffres adéquats pour obtenir toujours le même rapport toxine, quantité de milieu.

4.- LE MICROSCOPE ELECTRONIQUE :

Nous avons étudié au microscope électronique des lésions provoquées par la toxine sur les différentes cellules, après des temps d'inoculation variés et selon diverses doses de toxine ainsi que le mélange toxine-antitoxine, l'antitoxine étant ajoutée à des temps variables après l'inoculation de la toxine. Le microscope électronique était un R.C.A. (EMU III).

5.- LES COBAYES :

Les animaux dont nous avons examiné les cortico-surrénales après injection intra-musculaire dans la cuisse de doses variables de toxine, étaient des cobayes vierges de tout contact avec le bacille diphtérique et d'un poids moyen de 150 g. environ.

6.- ETUDE CYTOLOGIQUE DE L'EFFET DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

Nous avons donc étudié l'action de la toxine diphtérique à des dilutions croissantes sur différents types de cellules.

Nous avons utilisé des cellules d'origine cancéreuse KB, des cellules de rein de singe, des cellules de foie humain et des cellules d'amnios.

Celles-ci ont été cultivées en tubes de verre, dans un milieu de Ly, additionné de 10 % de sérum de veau.

Nous avons ajouté la toxine diphtérique purifiée au moment où nous avons obtenu une couche cellulaire uniforme.

Toutes ces cellules se sont montrées très sensibles à l'action de la toxine diphtérique, sauf les cellules amniotiques qui ne montrèrent aucune modification, même sous de fortes doses de toxine.

Nous avons examiné les tubes pendant trois jours au microscope optique.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

	<u>Dose de TD</u>	<u>KB</u>	<u>Amnios</u>	<u>Rein de singe</u>	<u>Foie humain</u>
24 heures	1 Lf/cc	+++	0	++	+++
	10 ⁻¹	+++	0	++	+++
	10 ⁻²	++	0	++	++
	10 ⁻³	+	0	0	+
	5.10 ⁻⁴	-			
2 jours	1 Lf/cc	+++	0		+++
	10 ⁻¹	+++	0	+++	+++
	10 ⁻²	+++	0	+++	+++
	10 ⁻³	+	0	++	+++
	5.10 ⁻⁴				
3 jours	1 Lf/cc	+++	0		+++
	10 ⁻¹	+++	0		+++
	10 ⁻²	+++	0		+++
	10 ⁻³	+++	0		+++
	5.10 ⁻⁴				

+++ = destruction complète

++ = plus de 50 % des cellules détruites

+

= destruction limitée.

0 = Absence de destruction.

Cet effet cytopathogène est bien différent de celui obtenu par la présence d'un virus car, à faible dose, la toxine n'attaque que quelques cellules, alors qu'un virus inoculé à très faible titre donne lieu, en se multipliant, à un effet cytopathogène généralisé à tout le tube.

Il apparaît donc que, sauf pour les cellules amniotiques qui ne parurent pas réagir à la toxine, les autres cellules étudiées ont une sensibilité à peu près équivalente.

- Un effet cytopathogène fut obtenu avec dose minima de toxine de
5 : 10^{-4} Lf/cc pour le foie humain
110⁻³ " pour les cellules de rein de singe
10⁻³ " pour les cellules KB.
- L'action de la toxine pour des cellules de cet ordre fut visible au bout de 24 heures et était parfaitement nette au bout de 48 heures avec une destruction presque complète des cellules.
- Dans tous les cas, nous avons inoculé des tubes témoins avec la solution tampon qui servait de diluant à la toxine et, dans aucun cas, nous n'avons obtenu d'effet cytopathogène, ce qui nous permet bien d'affirmer que seule la toxine était en cause dans l'effet cytotoxique obtenu.
- Mais si nous avions un effet cytotoxique très net au bout de 48 heures ou de 3 jours, surtout avec des doses fortes de toxine, nous avons rencontré d'assez grandes difficultés pour juger des réactions avec de faibles doses de toxine.

Pour évaluer la dilution minima de toxine qui provoquait des lésions cellulaires, il a fallu un examen très prolongé des tubes, en comparant ceux-ci avec les tubes témoins ; même en mettant en culture une quantité aussi voisine que possible des cellules dans les tubes, il est difficile d'avoir une culture absolument superposable d'un tube à l'autre. Et il est certain qu'il est très difficile, au bout de 24 heures, de juger de l'action d'une faible dose de toxine, de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} Lf/cc. Ce n'est alors qu'au bout de 48 heures à 3 jours que l'action de la toxine s'étant accentuée, l'effet cytopathogène devient plus aisément lisible.

C.- CORRESPONDANCE AVEC LA PEAU DE LAPIN

Et c'est là que le test de l'injection d'une toxine diphtérique à la peau du lapin montre sa beaucoup plus grande sensibilité que les cellules cultivées in vitro.

En effet, nous avons chaque fois effectué parallèlement des injections en intra-dermique au lapin, de dilutions croissantes de toxine.

Nous avons obtenu les résultats suivants, lus au bout de 48 heures :

Dose de T.D. en Lf/cc	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
R E S U L T A T S :					
(Diamètre de la papule en cm. au bout de 48 heures)					
1 ^{ère} Expérience	0	0,6	1,2	1,6	2,1
2 ^{ème} Expérience	0,6	1,2	2,5	N é c r o s e	
3 ^{ème} Expérience	0	0,6	1,2	1,3	1,5
4 ^{ième} Expérience	0,5	0,7	0,9	1,2	1,6

Il en ressort la beaucoup plus grande sensibilité de ce test puisqu'il permet de déceler des toxines de l'ordre de 10⁻⁵ à 10⁻⁶ Lf, c'est-à-dire 100 à 1 000 fois plus faibles qu'en cultures cellulaires.

D'autre part, cette réaction est beaucoup plus facile à lire et, sauf en cas de réaction véritablement nécrotique, très facile à mesurer .

D.- ETUDE CYTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

APRÈS COLORATION

Nous avons voulu étudier au microscope optique les modifications éventuelles que l'on pouvait observer après mise en contact des cellules avec la toxine diphtérique.

Pour ce faire, les cultures cellulaires ont été pratiquées de la même façon, mais dans des tubes dont le fond plat avait reçu une lamelle de verre. Les cellules se fixent, croissent très bien sur la lamelle et il fut très facile, au moment désiré, après avoir enlevé le milieu nutritif, de remplacer celui-ci par du liquide de Bouin pour fixer les cellules, puis de colorer les lamelles. Appliquées contre une lame et collées à celle-ci par du baume du Canada, nous avons ainsi pu les examiner au microscope optique.

L'inoculation de la toxine diphtérique a été comparable à ce qui a déjà été dit, et nous avons pratiqué une série de dilutions de toxine croissante avec mise en contact plus ou moins prolongée des cellules avec cette toxine (cellules K.B.)

En ce qui concerne les colorations, nous en avons utilisé deux, coloration au M^e. Grunwald Giemsa, et coloration à l'hématéine-éosine.

Etant donné qu'au bout de 48 heures en général toutes les cellules étaient détruites, nous nous sommes surtout attachés à l'examen des lamelles 24 heures après l'inoculation de la toxine.

Plusieurs points nous ont frappé :

- l'existence de vacuoles dans le cytoplasme, surtout nettes avec la coloration par le Giemsa. Ces vacuoles sont particulièrement importantes lorsque la dose de toxine est égale ou supérieure à 10^{-1} Lf/cc.
- Le noyau, par contre, reste toujours normal, même à des doses de toxine dépassant 10^{-1} Lf/cc.
- La diminution considérable du nombre des mitoses même avec des doses faibles de toxine, fait qui d'ailleurs avait déjà été signalé dans la communication de LEVADITI et MUTERMILCH à la Société de Biologie en 1913. Nous reviendrons sur ce fait ultérieurement.

- Enfin et surtout, la très grande différence de sensibilité parmi les cellules d'une même lamelle.

En effet, nous avons fréquemment rencontré sur le même champ microscopique des cellules normales à côté de cellules très dégénérées, avec côte à côte des cellules plus ou moins vacuolaires.

EXAMEN DES CELLULES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Nous avons tenté de préciser les modifications cytologiques des cultures cellulaires ayant reçu de la toxine diphtérique, au moyen du microscope électronique.

Comme au microscope optique, nous avons pratiqué les examens selon le temps d'inoculation de la toxine et selon les doses de celles-ci.

I.- LES DIFFÉRENTES CELLULES EXAMINÉES

- En ce qui concerne les cellules amniotiques, qui n'avaient pas paru réagir à la mise en contact avec la toxine, nous n'avons pas observé de lésions en microscopie électronique. Toutes les cellules ont gardé une morphologie normale, confirmant ainsi leur insensibilité à cet agent.
- En ce qui concerne le foie humain, nous avons découvert d'importantes lésions, identiques à celles que nous décrivons pour les cellules K.B. et les cellules de rein de singe, mais nous nous sommes aperçu que les cellules témoins, indemnes de contact avec la toxine diphtérique étaient aussi fréquemment endommagées. Ceci est sans doute la preuve de la très grande fragilité de ce matériel ; les lésions observées doivent sans doute être mises sur le compte d'une altération spontanée des cellules après un certain nombre de passages, à moins qu'il ne s'agisse d'altérations contemporaines de la fixation pour l'examen microscopique. C'est la raison pour laquelle nous pensons que si les cellules de foie humain sont un bon matériel pour suivre au microscope optique l'action d'une toxine diphtérique, il était de notre devoir de les écarter d'une étude au microscope électronique, étant donné les difficultés rencontrées pour interpréter les résultats.
- Nous avons donc reporté toute notre attention sur les cellules K.B. et les cellules de rein de singe. Celles-ci ont été fixées à l'acide osmique et incluses dans du méthacrylate avant de subir des coupes ultra-fines pour examen.

Nous avons commencé par étudier l'effet de la toxine au bout de 24 heures, mais plusieurs inconvénients nous ont fait rejeter cette méthode :

- beaucoup de cellules s'étaient déjà décollées du verre, en raison de leur dégénérescence et nous ne pouvions pas les examiner, de ce fait ; alors que ce sont elles qui auraient pu montrer les lésions les plus nettes ;
- parmi les cellules qui demeuraient en place et se trouvaient donc incluses dans le bloc à examiner, un certain nombre étaient normales, ce qui confirmait l'examen en microscopie optique, alors que d'autres, déjà très endommagées, voyaient leur dommage encore accentué par le couteau du microtome et devenaient, de ce fait, parfaitement ininterprétables. En effet, nous avons alors sur le treillis supportant la coupe, des cellules dont le cytoplasme était fragmenté en très nombreuses parcelles, dont le noyau paraissait souvent séparé du cytoplasme, dont les mitochondries étaient littéralement réduites à des fragments dont la taille interdisait toute possibilité d'examen.

Étant donné que les études de NORMAN-STRAUSS d'une part, de PAPPENHEIMER d'autre part, dont nous verrons ultérieurement les résultats, laissent prévoir une atteinte cellulaire environ 60 à 120 minutes après l'inoculation de la toxine, nous avons pensé que l'examen précoce des cellules serait d'un beaucoup plus grand intérêt.

Aussi, avons-nous surtout examiné les lésions obtenues sur des cellules étant restées en contact pendant 15, 30, 45 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 6 heures avec les doses de toxine suivantes : 1 Lf , 10^{-1} , 10^{-2} Lf/oc .

2.- LES LÉSIONS OBSERVÉES

Voici brièvement comment se présente une cellule K.B. ou une cellule de rein de singe, témoins :

- elles sont entourées d'une membrane cyto-plasmique simple ;
- le cytoplasme plus ou moins finement granuleux, est parsemé de mitochondries ;
- celles-ci se reconnaissent facilement non tant par leur forme allongée ou arrondie que par leur double membrane et les crêtes qui les segmentent, crêtes qui ne sont que des invaginations de leur membrane qui paraît ainsi les compartimenter ;
- un certain nombre de taches foncées représentent des enclaves lipidiques dans le cytoplasme ;

- le noyau, enfin, est entouré d'une double membrane et sur certaines coupes, on peut apercevoir la tache plus foncée d'un nucléole ;
- enfin, sur certaines coupes, apparaissent des éléments de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi, le premier caractéristique par son système de doubles membranes en amas ou en cercles concentriques avec des granulations denses, le second identifiable par ses petits paquets de 5 à 8 doubles lamelles à parois lisses, accompagnées de fines vésicules et de vacuoles de tailles irrégulières à la périphérie.

Les lésions observées en microscopie électronique apparaissent dès la première heure, même avec une dose de toxine relativement faible de 10^{-2} Lf/cc, qu'il s'agisse des cellules de rein de singe ou des K.B. Elles sont identiques quelle que soit la cellule, sauf en ce qui concerne les cellules amniotiques qui, encore une fois, sont apparues rigoureusement identiques aux cellules amniotiques témoins.

L'atteinte cellulaire siège uniquement au niveau des mitochondries.

Un premier stade nous a paru être l'augmentation du nombre de celles-ci qui se trouvent en nombre considérable dans le cytoplasme des cellules en début d'intoxication.

Puis la membrane à deux feuilletts qui entoure la mitochondrie paraît plus épaisse que celles des mitochondries témoins et il devient difficile de dissocier les deux feuilletts de leur membrane.

Les mitochondries semblent ensuite augmenter de volume, avec début de véritable vacuolisation, le plus fréquemment à leurs deux extrémités.

Cette vacuolisation, en s'accroissant, s'accompagne d'une disparition des crêtes transversales caractéristiques et bientôt la mitochondrie devient absolument boursoufflée, ovale, ayant perdu sa silhouette généralement allongée.

Ce dernier aspect se rencontre à peu près vers la sixième heure. Certes, avant ce délai, les premières anomalies décrites peuvent être visibles, mais en petit nombre, montrant encore une fois la différence de sensibilité qui peut exister entre les cellules d'une même culture. D'ailleurs, même au bout de 24 heures, on rencontre encore des cellules contenant des mitochondries normales.

Quoiqu'il en soit, dès la première heure après l'inoculation, des lésions sont déjà visibles.

Dans des délais de temps aussi courts, la dose de toxine ne paraît pas entrer en jeu et les lésions obtenues au bout de 1 à 3 heures avec une dose de toxine diphtérique variant de 10^{-2} à 1 Lf/cc. sont à peu près identiques en type et en intensité. Ce fait paraît s'expliquer encore par le degré de sensibilité différente d'une cellule à l'autre qui fait qu'à un stade donné de dégénérescence, la cellule se décolle spontanément du verre et ne se trouvera donc pas incluse dans le bloc à examiner.

Ces lésions mitochondriales, enfin, ne sont certainement pas dues à une action autre que celle de la toxine diphtérique ; certes, il ne s'agit pas là d'une lésion spécifique et une altération des mitochondries peut se voir au cours du développement d'un virus dans une cellule . Mais ces lésions n'en demeurent pas moins évidentes et au moment de l'interprétation de ces résultats, nous discuterons de leur signification.

D'autre part, des altérations mitochondriales peuvent s'observer lors de la dégénérescence spontanée de cellules. Mais alors il s'agit de faits épars, ce qui ne fut jamais le cas ici, comparé aux cellules témoins cultivées dans les mêmes conditions et fixées au même instant.

Resterait à discuter l'altération des mitochondries provoquées par une mauvaise fixation et l'on sait que l'on donne comme critère d'une bonne fixation des mitochondries allongées, aux crêtes bien visibles et non ballonnées. Mais, dans cette étude, nous ne pensons pas que l'on puisse mettre en cause une mauvaise fixation étant donné que nous avons toujours utilisé la même méthode pour fixer les cellules intoxiquées et les cellules témoins et que les mitochondries des coupes témoins étaient normales.

Ces lésions mitochondriales ont été les seules que nous ayons observées. En effet :

- le noyau fut toujours respecté, sa double membrane toujours intacte ;
- le cytoplasme ne nous a pas paru être le siège de modifications ;
- l'ergastoplasme et l'appareil de Golgi sont apparus indemnes ;
- la membrane cytoplasmique enfin nous a paru morphologiquement normale, non épaissie.

Nous avons essayé d'observer également si l'on pouvait noter des lésions dans des temps plus courts et pour cela

nous avons photographié des cellules K.B. après 15, 30 et 45 minutes de contact avec une dose de toxine de 1 Lf/cc.

Voici les conclusions que l'on peut tirer :

- . au bout d'un quart d'heure et même d'une demi-heure, il n'existe aucune lésion apparente et la cellule qui a subi ce début d'intoxication ne peut absolument pas être différenciée d'une cellule témoin ;
- . au bout de trois quarts d'heure, les lésions visibles sont encore exceptionnelles et ce n'est que de façon tout-à-fait rare que l'on voit, au milieu des mitochondries normales, une mitochondrie dont les crêtes sont épaissies, dont le corps paraît en début de vacuolisation.

3.- LES CELLULES PROTÉGÉES PAR L'ANTITOXINE

Enfin, nous avons contrôlé au microscope électronique l'action protectrice obtenue par l'antitoxine vis-à-vis de la toxine sur les cultures cellulaires.

LENNOX et KAPLAN faisant un mélange de quantité variable d'antitoxine avec une quantité fixe de toxine pendant trente minutes avant d'ajouter ce mélange à la culture cellulaire, avaient noté que la toxine était neutralisée quand le rapport antitoxine-toxine était un peu supérieur à 1.

Nous avons pratiqué la série d'expériences suivante :

- cellules K.B. mises au contact de l'antitoxine seule (2 uf/cc.
- cellules K.B. ayant reçu simultanément 1 Lf/cc. de toxine diphtérique et 2 uf/cc. d'antitoxine ;
- cellules ayant reçu une dose de toxine de 1 Lf/cc. puis, au bout d'une heure, dans une série, et de deux heures dans une autre série, la dose de 2 uf/cc. d'antitoxine.

Les cellules ont été examinées au microscope optique au bout de 24 heures, sans coloration. Elles n'étaient pas le siège d'un effet cytopathogène d'une part, et d'autre part ne paraissaient pas modifiées dans leur morphologie.

Toutes ces cellules ont été fixées au bout de ces 24 heures à l'acide osmique, incluses au métacrylate et examinées au microscope électronique.

Nous avons constaté les faits suivants :

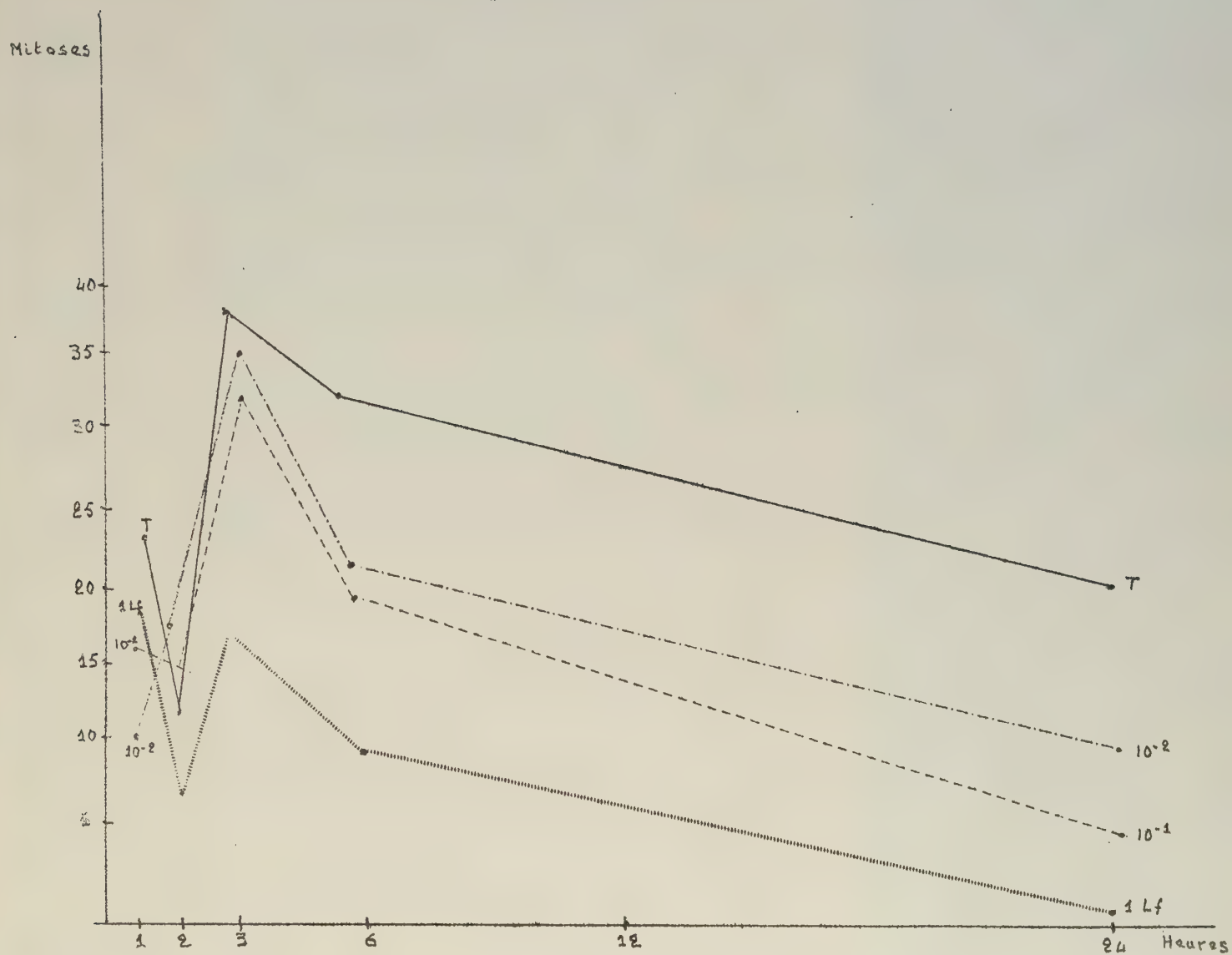
- un petit nombre de cellules étaient rigoureusement normales ;
- par contre, la majorité d'entre elles étaient profondément modifiées. En effet, le noyau, lui-même normal, était entouré d'une masse claire, amorphe, volumineuse, refoulant tout le parenchyme cytoplasmique à la périphérie. Ce cytoplasme, de ce fait, fut difficile à examiner, car le plus souvent il se trouvait réduit à une très faible épaisseur. Néanmoins, aux endroits où l'on pouvait l'étudier dans les meilleures conditions, il est apparu normal, notamment les mitochondries.

Il semble donc bien que l'antitoxine protège parfaitement les cellules de l'action de la toxine, même lorsque celle-ci est ajoutée deux heures après l'inoculation de la toxine aux cellules.

Quant à cette masse apparue dans le cytoplasme, on peut penser qu'il s'agit de l'antitoxine qui a pénétré à travers la membrane cellulaire et qui a été coagulée par l'action de l'acide osmique, car nous avons retrouvé les mêmes aspects sur les cellules témoins n'ayant reçu que de l'antitoxine.

Il n'en demeure pas moins que l'on peut être étonné, en voyant à quel degré le cytoplasme est repoussé à la périphérie, de penser que le fonctionnement cellulaire se maintient intégralement. Il est possible, cependant, que la fixation à l'acide osmique soit à l'origine d'artefact et qu'en fait ce que l'on voit au microscope soit en partie faux, l'antitoxine dans la cellule vivante respectant mieux le cytoplasme cellulaire.

GRAPHIQUE



Témoin : _____
 Toxine 10^{-2} Lf/cc :
 Toxine 10^{-1} Lf/cc : - - - - -
 1 Lf/cc :

EXAMEN AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE SURRENALES DE COBAYE AYANT RECU DE LA TOXINE DIPHTERIQUE

Il a paru intéressant d'essayer de retrouver les mêmes lésions histologiques chez l'animal ayant reçu de la toxine diphtérique.

Nous avons choisi pour cette expérimentation le cobaye qui est très sensible à l'action de la toxine ; nous avons utilisé les cobayes très jeunes dont le poids n'excédait pas 200 grammes.

Nous leur avons injecté la toxine par voie intra-musculaire et nous avons prélevé les surrénales, au bout d'un temps variable, sous anesthésie à l'éther, en agissant le plus rapidement possible afin de raccourcir au maximum les délais avant la fixation.

Les surrénales ont été fixées soit au permanganate de potasse, soit à l'acide osmique et incluses soit dans du métachylote, soit dans de l'arraldite.

Un certain nombre de problèmes se sont alors posés :

- celui de la dose de toxine à injecter à l'animal de façon à obtenir une surrénalité qui ne soit pas trop hémorragique, ce qui gênerait la fixation, et de façon à ce que l'animal soit encore en vie au moment de la surrénalectomie ;
- celui du moment où il fallait faire la surrénalectomie, ne connaissant pas exactement la vitesse de diffusion de la toxine dans l'organisme ;
- nous avons choisi la surrénale car, à priori, nous pensions trouver des lésions, mais nous aurions pu choisir également le foie qui, lors d'une intoxication diphtérique, est aussi le siège de lésions. Des déboires répétés lors de la fixation nous ont fait rejeter ce matériel.
- enfin, se posait le problème de la localisation des lésions dans la surrénale. Les hémorragies sont en microscopie optique retrouvées dans toutes les parties de la cortico-surrénale, mais avec une nette prédominance dans la zone réticulée.

Il nous a été extrêmement difficile, en microscopie électronique qui ne permet l'examen que de fragments très petits, d'avoir la certitude d'être exactement dans la zone réticulée. Aussi, lors de la fixation, avons-nous fait des blocs différents de la cortico-surrénale, partant de la superficie à la profondeur, et en les examinant successivement, nous pensons avoir examiné à peu près complètement un fragment important de la cortico-surrénale.

Les résultats que nous avons obtenus ont été généralement décevants :

- l'examen d'une surrénale 18 heures après l'injection d'une dose de toxine diphtérique de 1 Lf/cc. ne nous a pas montré de lésions nettes. En effet, par comparaison avec des fragments de surrénale d'un cobaye sain, nous n'avons noté ni lésion des mitochondries, ni aucune autre lésion;
- nous avons donc décidé d'injecter de très fortes doses de toxine et d'examiner les tissus beaucoup plus tôt ;
- c'est ainsi qu'une surrénale a été examinée six heures après injection d'une dose de 5 Lf. Là encore, nous n'avons noté aucune lésion visible sur les fragments de coupe;
- six heures après l'injection de 10 Lf de toxine, nous n'avons encore retrouvé aucune anomalie ; les membranes cytoplasmiques et nucléaires, les noyaux, les mitochondries étaient normales.
- ce n'est qu'après l'injection d'une dose de 10 Lf de toxine et prélèvement de la surrénale au bout de huit heures que nous avons découvert des lésions, d'ailleurs assez discrètes : début de ballonnisation et de vacuolisation des mitochondries, le reste du tissu de la glande apparaissant normal sur les fragments examinés.

Mêmes discrètes, ces lésions cependant confirment celles que l'on avait rencontré en culture de tissus. Là encore, elles ne semblent pas pouvoir être mises sur le compte d'une mauvaise fixation, car elles sont très parcellaires et que le reste des cellules paraît normal.

ACTION ANTI-MITOTIQUE

DE LA

TOXINE DIPHTERIQUE

Nous avons voulu, enfin, étant donné la diminution marquée du nombre des mitoses visibles après coloration des cultures cellulaires, voir si l'on pouvait déduire une relation entre la dose de toxine inoculée aux cellules et le nombre des mitoses visibles.

Nous avons pour cela, refait des cultures sur lamelles, introduit la toxine lorsque la nappe cellulaire était presque confluyente et nous avons compté les mitoses, en tenant compte du temps et de la dose de toxine.

En les comparant avec des lamelles témoins colorées également au May Grunwald Giemsa, nous avons étudié la série suivante de dilutions de toxine :

1 Lf/cc.
10-1 "
10-2 "

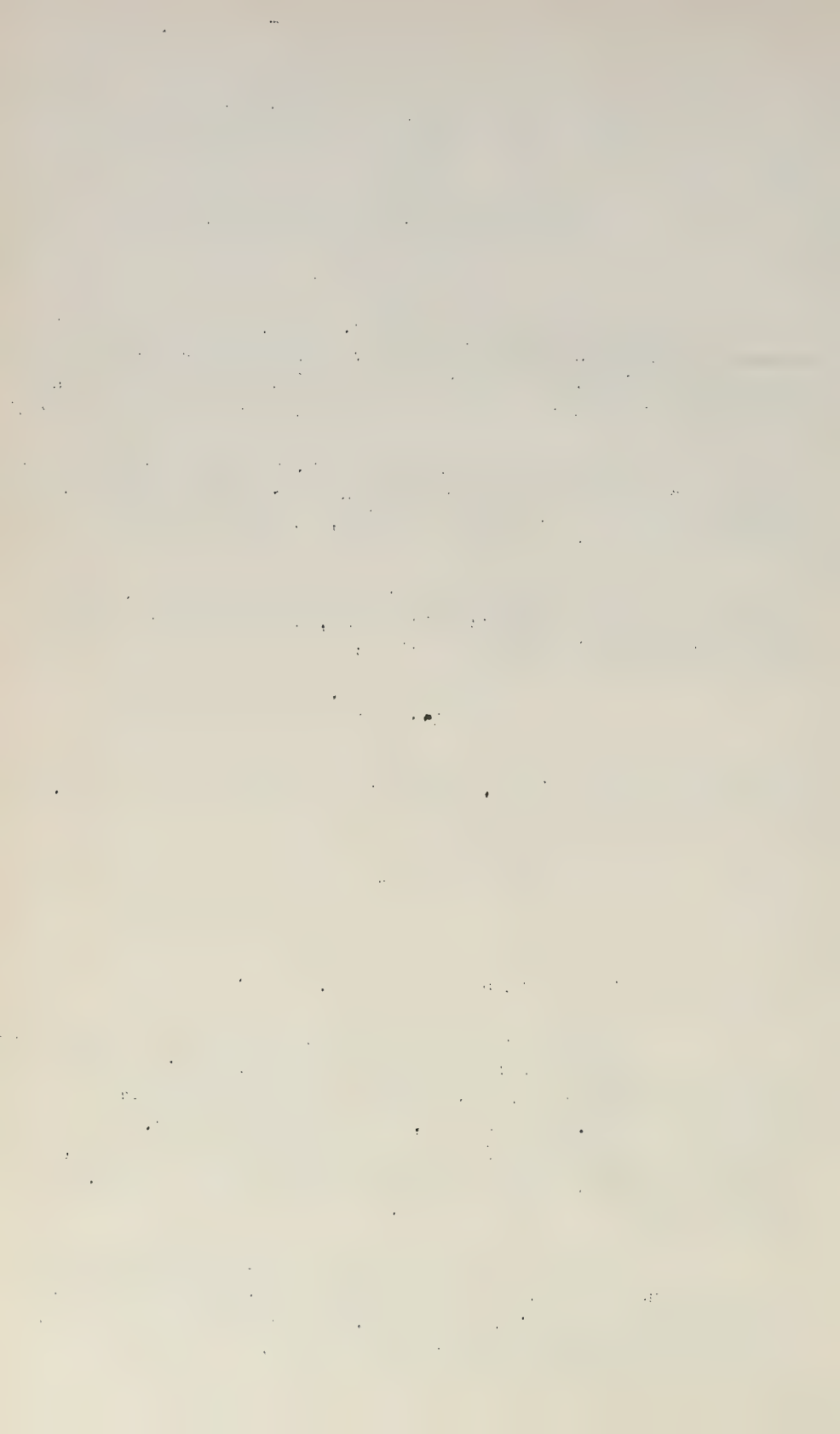
qui ont été fixées, en même temps que les tubes témoins, au bout de :

1 heure
2 heures
3 "
6 "
24 "

après l'inoculation de la toxine.

Sur chaque lamelle nous avons compté sur un certain nombre de champs le nombre de mitoses visibles, en s'efforçant de faire ce compte sur des champs où les cellules formaient une nappe à peu près confluyente. Bien entendu, à la dose de 1 Lf/cc. au bout de 24 heures, la densité cellulaire était devenue extrêmement faible, mais ceci ne doit pas avoir faussé les résultats car, dans ce cas, le nombre de mitoses avoisinait le zéro.

Après avoir fait la moyenne de mitoses observées pour chaque dilution de toxine et pour chaque lamelle témoin, voici le graphique que l'on a obtenu , les heures étant en abscisses et en ordonnées les chiffres des mitoses.



L'étude comparée de ces courbes permet de tirer les conclusions suivantes :

- A forte dose de toxine (1 Lf/cc.) , l'action antimitotique est rapide puisque dès la deuxième heure, le nombre de mitoses est en régression sensible par rapport aux lamelles témoins.
- A doses moins élevées, l'effet de la toxine ne se fait guère sentir avant la troisième heure, puisque le nombre de mitoses est sensiblement équivalent à celui des témoins.
- La chute du nombre des mitoses après la troisième heure est d'autant plus forte que la concentration en toxine est plus élevée :
 - au bout de 24 heures, alors que par champ on en compte en moyenne vingt chez les témoins, il n'y en a plus que quinze à 10^{-2} Lf/cc; deux à 10^{-1} Lf et une seule à 1 Lf/cc.
- Il faut noter également que le nombre de mitoses sur les lamelles témoins s'était également abaissé de façon sensible puisque de trente-huit à la troisième heure, il atteignait seulement vingt au bout de vingt-quatre heures.

Nous reviendrons sur ces résultats lors de l'interprétation globale de l'action de la toxine diphtérique sur les cellules.

INTERPRETATION DE L'ACTION DE LA TOXINE DIPHTERIQUE

A.- LA TOXINOGENÈSE ET LE PROPHAGE

En 1951, FREEMAN fit une découverte dont l'importance paraît considérable : il convertit des souches non toxigènes de bacilles diphtériques en souches toxigènes en provoquant une lysogénie de ces bacilles par un prophage.

Jusqu'à cette date, de nombreux faits avaient montré l'existence d'un certain nombre de souches de bacilles diphtériques non toxigènes.

En 1917, ROSEMAN et BACLEY avaient conclu que ces bacilles avirulents constituaient un groupe très différent des bacilles virulents. Et, en 1929, OKELL, pour sa part, pensait que jamais une souche de bacille diphtérique ne pouvait devenir virulente lorsqu'elle était avirulente, ni in vivo, ni in vitro et qu'en aucun cas, elle ne pouvait être à l'origine d'une diphtérie clinique.

Mais le problème s'est trouvé singulièrement compliqué lorsque PROBISHER et ses collaborateurs observèrent, au cours de certaines diphtéries indiscutables, la présence de souches totalement avirulentes, ce qui leur fit penser à "un pouvoir pathogène subtil inexpliqué" de telles souches.

Les expériences de FREEMAN demandèrent une très grande minutie puisqu'il fallait être sûr, lors d'expérimentations sur des bacilles avirulents, qu'il n'existait pas dans les cultures, même en très petit nombre, quelques bacilles virulents. Aussi, commença-t-il par faire des isollements en série et des purifications extrêmement soigneuses des cinq souches de bacilles diphtériques avirulents qu'il étudia, quatre de ces souches étant : sensibles aux bactériophages A et B, la cinquième s'étant montrée résistante.

Après incubation de ces quatre souches sensibles, avec le phage spécifique B qui provoque leur lyse, FREEMAN obtint quatre souches de bacilles diphtériques virulent , alors que le bactériophage A qui ne provoque qu'une lyse réduite ne donne naissance à aucune souche toxigène. Quant à la cinquième souche avirulente, insensible à l'action des deux bactériophages, elle ne fut pas modifiée dans ses caractères.

La présence de toxine diphtérique après action de ce bactériophage fut testée selon toutes les techniques connues : injection intra-dermique et sous-cutanée à l'animal sensible, et in vitro selon la technique d'OUCHTERLONY, les résultats étant en parfaite concordance.

Pour s'assurer qu'il s'agissait bien de toxine diphtérique, c'est-à-dire d'une substance extra-cellulaire, il filtra les cultures et obtint effectivement cette toxine.

Complétant cette remarquable découverte, FREEMAN put démontrer que les souches virulentes qu'il avait isolées des lysats de cultures de bacilles non toxigènes après action des bactériophages, étaient parfaitement stables, qu'elles étaient résistantes au bactériophage B, qu'elles étaient devenues lysogènes.

Ces expériences ont été reprises par d'autres auteurs, dont les résultats confirment ceux de FREEMAN, ce qui permet actuellement de donner une explication à ces cas de diphtérie en apparence provoqués par des bacilles non toxigènes, la toxicogénèse n'étant pas le fait de la présence de quelques bacilles virulents parmi d'autres non virulents, mais bien le fait de bacilles diphtériques lysogènes.

D'autre part, on avait ainsi la preuve que si une bactérie lysogène peut voir, comme cela est fréquent, sa virulence nettement diminuée par rapport aux bactéries non parasitées d'une même souche, il est des cas, ainsi que le prouve le bacille diphtérique, où la lysogénisation provoque l'apparition de virulence là où il n'y en avait pas auparavant.

B.- PAPPENHEIMER ET SES TRAVAUX SUR LA TOXINE DIPHTERIQUE

Entre 1947 et 1954, PAPPENHEIMER étudia très longuement les mécanismes possibles de l'intoxication diphtérique.

On sait qu'un excès de fer dans un milieu de culture interfère avec la production de toxine par le bacille diphtérique. Ainsi, si l'on augmente la quantité de fer contenu dans le milieu, les deux courbes de croissance des bacilles et de production de toxine sont d'abord parallèles, puis à partir d'une concentration en fer de 1/10 mg. par litre, alors que la croissance des germes s'accroît encore, la production de toxine diminue.

Quand la production de toxine est effective, on assiste en même temps à l'apparition dans le milieu de culture de coproporphyrine III, avec une remarquable proportionnalité entre les concentrations des deux produits, dans un rapport moléculaire d'environ 1/4.

Dans les bactéries, environ 90 % dell'hème ferrique paraît être lié au principal pigment respiratoire du germe, le cytochrome bl. Or, la quantité de cytochrome b, présente dans les bactéries riches en fer, paraît approximativement équivalente à la quantité de porphyrine trouvée dans le milieu de culture de bacilles pauvres en fer.

Il paraît donc y avoir une relation quantitative entre le contenu en cytochrome des bacilles, la toxine et la coproporphyrine, ce qui suggère une relation possible entre la toxine et la partie protéique du cytochrome bl.

Lorsque le milieu de culture contient un excès de fer, ou lieu de toxine, sont produits en grande quantité du cytochrome b ou d'une protéine étroitement apparentée ; comme le cytochrome b contient par molécule quatre radicaux hemes, il en résulte que la toxine pourrait être la moitié protéique du cytochrome b diphtérique. D'ailleurs, les bacilles croissent en milieu pauvre en fer pourraient encore réussir la synthèse de la partie protéique de la porphyrine mais ne pourraient pas les combiner en cytochrome b.

A partir de ces faits, PAPPENHEIMER s'est demandé si la toxine diphtérique n'agissait pas chez les sujets intoxiqués, par l'intermédiaire de leurs systèmes cytochromes.

La preuve directe en aurait été apportée, s'il avait été possible de synthétiser la toxine à partir du cytochrome b diphtérique ou si, à partir de la toxine, du fer et de la porphyrine, on était arrivé à préparer du cytochrome b. Ces essais ont échoué.

Par contre, en 1952, travaillant sur un ver à soie, le *Plastymia cooropia*, PAPPENHEIMER arrive à des résultats intéressants : en effet, au moment de sa transformation de chenille en pupa, ce ver devient à peu près dépourvu de système succinoxydase et de cytochromes b et c. Il en reste cependant un peu dans les muscles intersegmentaires de l'abdomen, alors que, notamment dans le muscle cardiaque, il ne reste que des cytochromes b₅, A + a₃. Ce n'est que lors de la transformation en papillon que réapparaissent d'abord le cytochrome c, puis le cytochrome b et les oxydases.

Or, la sensibilité de l'animal à la toxine diphtérique est très différente selon ces stades.

En effet, lors du stade de la pupe, l'injection de toxine diphtérique n'a pas d'effet léthal ; seuls subissent une nécrose les muscles intersegmentaires de l'abdomen, alors que le muscle cardiaque continue de battre pendant plusieurs semaines après disparition de toute musculature abdominale.

Au contraire, si l'on injecte la toxine à un papillon adulte, la mort survient en quelques jours, de même que pour les larves.

Autrement dit, seuls les muscles contenant des cytochromes b et c sont atteints, ceux qui en sont dépourvus ne réagissent pas à l'injection de toxine. Cette découverte a fait naître l'hypothèse que la toxine bloquerait la synthèse du cytochrome b ou d'un enzyme très voisin.

En s'attaquant au cytochrome b, la toxine diphtérique agirait ainsi sur un des maillons du système des oxydoréducteurs.

A partir de cette hypothèse, PAPPENHEIMER avait proposé une explication séduisante pour expliquer le mode d'action de cette toxine : ressemblant d'assez près à la moitié protéique du cytochrome b et injectée à l'animal d'expérience, elle serait alors capable d'entrer en concurrence avec le système qui synthétise ce cytochrome, mais sa ressemblance ne serait toutefois pas suffisante pour permettre son incorporation à celui-ci.

Cette explication a encore l'avantage de permettre la compréhension du retard observé dans l'action de la toxine diphtérique chez l'animal et son temps de latence, par la nécessité pour cet animal d'épuiser d'abord sa provision de cytochrome b avant que n'apparaissent les premiers signes de la maladie.

Ces expérimentations remarquables de PAPPENHEIMER, ont cependant longtemps été les seules qui fournissaient une explication à l'intoxication diphtérique.

Mais il faut bien reconnaître qu'il demeurerait difficile d'extrapoler la totalité des résultats obtenus chez le ver à soie pour les appliquer à l'animal d'expérience ou à l'homme.

Depuis cette date, d'autres voies d'étude ont été ouvertes, s'orientant dans une direction tout à fait différente, puisque les cultures cellulaires d'une part, la chimie des éléments marqués radioactifs d'autre part ont, en association, apporté un matériel d'étude sensiblement plus simple que le fameux cecropia.

Ces travaux, NORMAN STRAUSS et HENDEE, PAPPENHEIMER les ont entrepris, dans le but de rechercher les modifications métaboliques des cellules cultivées in vitro avant et après intoxication par la toxine diphtérique.

C.- LES TRAVAUX DE STRAUSS, KATO ET PAPPENHEIMER

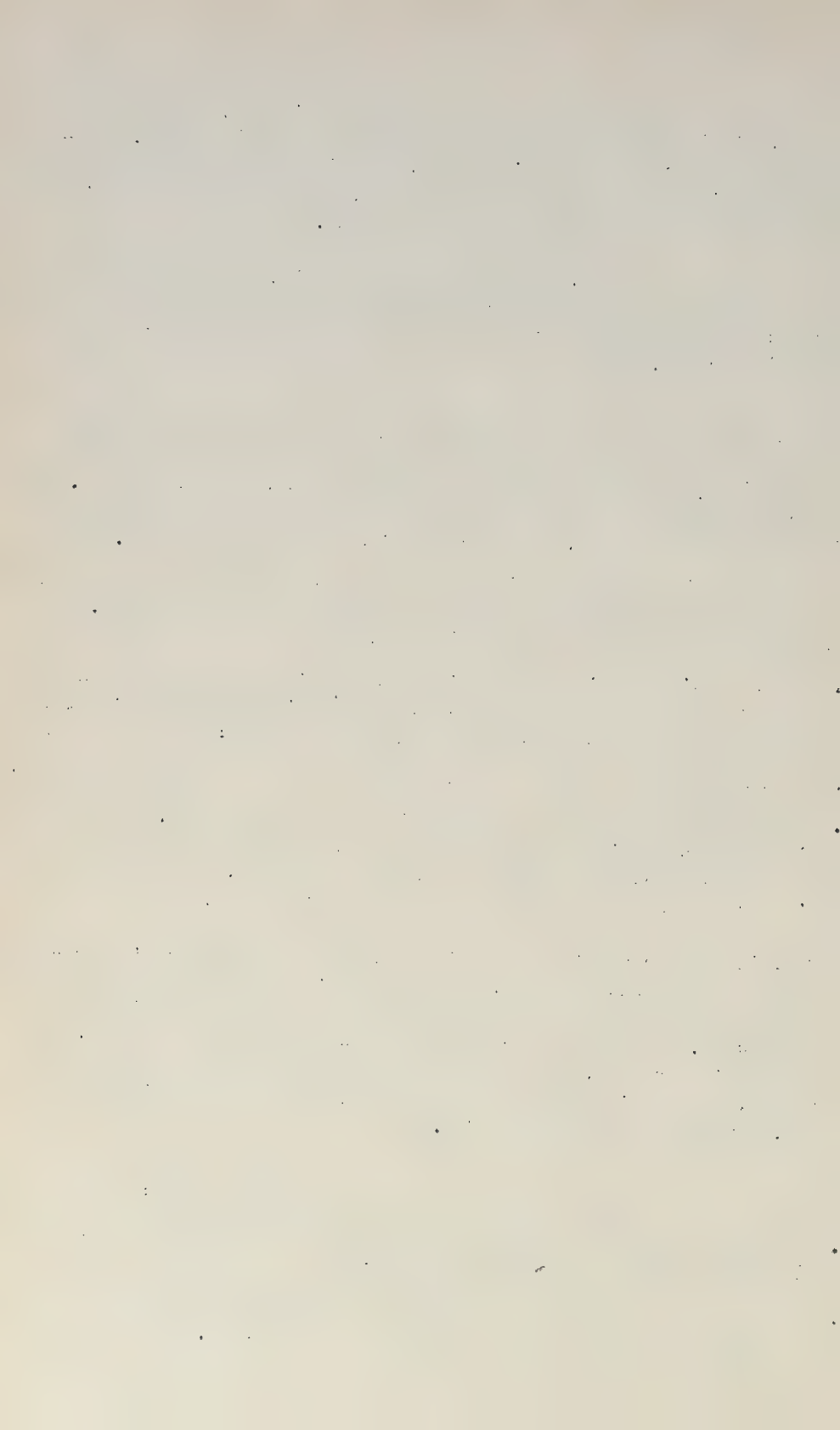
- Les premiers, Norman STRAUSS et HENDEE ont publié, en février 1959, les résultats de leurs expériences sur le métabolisme des cellules HeLa cultivées in vitro, après action d'une toxine diphtérique.

Ils ont étudié l'absorption de méthionine marquée S 35 par les cellules HeLa mises en contact avec de la toxine diphtérique. Leurs constatations furent les suivantes :

- la toxine n'a pas d'effet sur l'apparition d'acide lactique avant le début de la destruction cellulaire et il n'y a donc pas d'action primitive de la toxine sur la glycolyse cellulaire ;
 - il existe une inhibition par contre précoce de la synthèse protéique ;
 - en ce qui concerne l'absorption de la méthionine marquée, le moment d'apparition de l'inhibition est plus ou moins précoce selon que la concentration en toxine est plus ou moins forte, avec une période d'absorption normale qui ne dépasse jamais une heure.
- Enfin, ils comparent l'action de la toxine diphtérique sur l'absorption de la méthionine marquée, avec celles d'agents comme le cyanure ou le 2 Dinitrophénol qui influent sur les systèmes respiratoires des cellules. Ces corps exercent une action immédiate de ralentissement de l'absorption, les cellules restent longtemps apparemment normales, alors qu'avec la toxine diphtérique, dès la quatrième heure, leur morphologie se modifie.

STRAUSS et HENDEE concluaient de ces résultats :

- que la glycolyse et la respiration aérobie ne sont pas intéressées directement par l'action de la toxine ;
- la synthèse protéique est complètement inhibée au bout de deux heures en présence de dose saturante de toxine ;



- ils mettent ce retard dans l'arrêt de l'absorption sur le compte de plusieurs facteurs, dont :

- = le temps nécessaire à l'absorption de la toxine par les cellules, cette absorption de toxine étant distincte des processus par lesquels la toxine cause des dégâts irréversibles dans les cellules.

(ceci étant prouvé par des expériences de lavages des cellules intoxiquées qui absorbent normalement la méthionine et par la neutralisation presque instantanée de la toxine par l'antitoxine).

- Ils insistaient, comme LENNOX et KAPLAN, sur les différences de sensibilité des cellules cultivées, supposant qu'il existe également une grande variation de sensibilité à la toxine entre les cellules des différents tissus in vivo ; cette différence de sensibilité , ils la mettent sur le compte possible :

- d'une variation dans la perméabilité à la toxine ;
- à une capacité diminuée d'absorption de la toxine, due aux variations des structures de surface des cellules .

- Enfin, ils essayent d'expliquer le retard d'inhibition de l'absorption de la méthionine, outre le temps nécessaire à la toxine pour pénétrer dans la cellule par :

- le temps nécessaire à l'accumulation de substance destructive ;
- l'épuisement d'une masse commune de matière vitale ;
- la destruction de certaines structures cellulaires qui affecte directement la synthèse protéique.

Et ils tentaient de conclure en comparant leurs résultats à ceux de PAPPENHEIMER sur le oocrophia. Pour ces auteurs, on pouvait éliminer l'hypothèse que la toxine détournait la synthèse des cytochromes sur le fait que toutes les synthèses protéiques se trouvaient bloquées dans un temps très court sous l'action de la toxine diphtérique.

D'autre part, il était incontestable que des agents chimiques, comme le cyanure ou le dinitrophénol, qui agissent sur les systèmes respiratoires cellulaires, autrement dit sur les systèmes cytochromes, avaient une action tout à fait différente de celle de la toxine puisque cette action était pratiquement instantanée.



Cependant, cette première série d'expériences ne permettait pas de vérifier si la toxine dissociait les deux phénomènes d'oxydation et de phosphorylation.

- En 1960, Norman STRAUSS a tenté de compléter son travail par une expérimentation de l'effet de la toxine diphtérique sur le métabolisme des acides nucléiques et des phosphates organiques acido-solubles des cellules HeLa.

Utilisant la thymidine et l'uridine marquée, ainsi que le phosphore P 32, il a surveillé l'incorporation de ces produits dans la cellule normale et intoxiquée et fait les constatations suivantes :

- la toxine ne paraît pas affecter la synthèse de l'acide nucléique avant la quatrième ou cinquième heure, moment auquel l'incorporation de thymidine et d'uridine marquée devient sensiblement moindre ;
- d'autre part, les cellules cultivées en présence de phosphore P 32 et subissant l'intoxication, commencent à éliminer ce P 32 environ une heure et demie après le début de l'intoxication.

- Enfin, STRAUSS a étudié l'effet de la toxine sur des cellules cultivées en milieu saturé en acides aminés, et a constaté que ce supplément d'acides aminés ne modifiait pas le taux d'incorporation de la méthionine marquée, ce qui lui fait supposer que la sortie d'acides aminés n'est pas responsable par elle-même de l'arrêt dans la synthèse protéique.

Au contraire, le dinitrophénol agit différemment de la toxine dans ces études : en effet, cet agent stoppe immédiatement la synthèse de l'acide nucléique lorsqu'il est ajouté aux cellules ; d'autre part, il diminue rapidement et à un taux important l'incorporation du phosphore P 32 dans les nucléosides des cellules.

Ainsi donc, la toxine diphtérique ne paraît avoir aucune des actions qu'a le dinitrophénol qui est un agent bien connu de découplage des réactions d'oxydation et de phosphorylation.

La sortie du phosphore P 32 de la cellule, au bout d'environ 1 heure et demie coïncidant avec l'arrêt de l'incorporation de méthionine serait le témoin d'une très petite modification dans la membrane cellulaire survenant avant la première heure d'intoxication.



Non seulement la toxine n'a donc pas d'action identique à celle des découpleurs, mais ses effets sur la cellule seraient ceux d'une nature drestique aboutissant à la destruction cellulaire commençant dès la quatrième ou cinquième heure.

Et pour STRAUSS, la toxine pourrait agir de deux façons :

- soit directement sur la synthèse protéique et dont découlent des effets secondaires sur la synthèse de l'acide nucléique et la dégénérescence cellulaire ;
- soit en affectant d'abord la structure cellulaire telle qu'une lésion de la membrane, ce qui causerait des effets secondaires d'arrêt des processus cellulaires.

C'est cette dernière hypothèse qui lui paraît la plus probable, en raison notamment de la rapidité avec laquelle la cellule commence sa destruction. De plus, il ne pense pas qu'une molécule de toxine, d'un poids moléculaire de 70.000 et d'un pH de 4,5, puisse diffuser rapidement et élimine la possibilité d'une forme de transport actif de la toxine dans la cellule sur le fait que la toxine peut détruire la cellule en présence de dinitrophénol dans les mêmes conditions que seule.

- Au même moment, IWAŌ KATO et PAPPENHEIMER ont publié les résultats de leurs travaux sur l'effet précoce de la toxine diphtérique sur le métabolisme des cellules en culture.

Ils ont observé l'absorption par des cellules normales de rein humain, de la méthionine marquée S 35, du potassium K 42, l'incorporation du phosphore P 32 dans l'acide adénosonisé triphosphorique, l'effet enfin de la toxine diphtérique sur la synthèse de l'acide nucléique et la formation de l'adénine nucléotide.

Leurs travaux les ont conduits aux résultats suivants :

- l'absorption de méthionine est arrêtée après un certain temps de latence, ce temps de latence suggérant qu'un précurseur dans la synthèse protéique doit être épuisé avant que la toxine puisse exercer son effet léthal. La nature de ce précurseur est indéterminée, mais ne paraît pas être un pool d'acides aminés, car si des cellules M K sont mises dans un milieu sans acides aminés sauf de la méthionine afin de leur faire épuiser leurs réserves d'acides aminés, quand on les remet dans un milieu normal en présence de toxine, la période latente reste d'une durée identique et ne se trouve pas raccourcie;

D'autre part, durant cette période latente qui précède l'arrêt d'incorporation de la méthionine marquée, la toxine diphtérique ne semble pas pénétrer dans la cellule car, comme STRAUSS et HENDEE, PAPPENHEIMER a fait l'expérience d'ajouter de l'antitoxine dans les 30 minutes qui suivent l'incorporation de toxine, ou encore de lever plusieurs fois des cellules en contact pendant 30 minutes avec de la toxine, et dans les deux cas, les cellules ont continué d'absorber normalement, au moins pendant plusieurs heures, la méthionine marquée. Ces faits suggèrent aux auteurs que la toxine diphtérique doit exercer une action à la surface de la cellule.

L'absorption de K 42 par les cellules se fait normalement pendant au moins deux heures, ce qui fait penser que le dommage de la membrane cellulaire commencerait seulement à ce moment-là.

- En ce qui concerne la synthèse à l'acide nucléique, PAPPENHEIMER au moyen du P 32 a noté que la synthèse de l'acide ribo nucléique se maintenait dans les cellules intoxiquées à un taux normal pendant environ une heure, avant d'observer un ralentissement brusque dans cette incorporation, tandis que l'incorporation de P 32 dans le D.N.A. paraît normale pendant trois heures.
- Par contre, l'incorporation de P 32 dans l'adénosine triphosphorique fut arrêtée très précocement dans les cellules intoxiquées, ce qui fait penser à cet auteur qu'il s'agit là d'un effet primaire de la toxine dès que celle-ci a agi sur la surface cellulaire, et que la toxine interfère avec le transport du phosphate à travers la membrane cellulaire. Cette action est spécifique car prévenue complètement par adjonction d'antitoxine.

Cette action est inhibée à des températures de 10°.

- PAPPENHEIMER a encore observé l'action de l'antimycine A sur l'incorporation du P 32 dans l'acide adénosine-triphosphorique des cellules M.K.

Ce corps est un inhibiteur qui bloque le transport des électrons dans le système cytochrome, entre le cytochrome b et le cytochrome c. Or, mis au contact des cellules, il réduit l'incorporation du P 32 dans l'A.T.P. des cellules de la même façon que les doses saturantes de toxine.

- Enfin, l'auteur a étudié l'action de la toxine et de l'antimycine A sur des cellules de rate de souris, animal extrêmement peu sensible à l'action de la toxine. Ceci lui a permis de constater que la toxine

diphthérique à doses considérables n'avait pas d'effet sur l'absorption de P 32 par ces cellules, ni sur l'incorporation de la méthionine marquée S 35, ou moins pendant 5 heures. Au contraire, l'antimycine a une action rapide sur le taux d'incorporation de la méthionine marquée par les cellules de rate de souris, mais n'a pas non plus d'effet sur l'incorporation du P 32 par ces cellules.

Au terme de ces travaux, les conclusions de PAPPENHEIMER sont les suivantes :

= Il est probable que la toxine diphthérique agit d'abord à la surface de la cellule avant d'y pénétrer. Bien que cette toxine ne semble pas avoir d'effets directs sur le transfert d'électrons, il est possible qu'elle interfère avec la phosphorylation oxydative de la chaîne des cytochromes, comme le faisaient penser les expériences sur le ver à soie cecropia. Et la toxine agirait d'abord à la surface de la cellule par inhibition de la phosphorylation oxydative de la chaîne des cytochromes qui est impliquée dans le transport du phosphate inorganique à travers la membrane cellulaire. Il faut noter que l'antimycine, qui paraît agir comme la toxine, agirait dans le système cytochrome entre les cytochromes b et c et que les expériences sur le cecropia faisaient penser que la toxine agit sur le cytochrome b ou entre les cytochromes b et c I.

D.- NOS RECHERCHES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE APPORTENT-ELLES DES ARGUMENTS EN FAVEUR DE CETTE HYPOTHÈSE ?

Il est un premier point certain, c'est que nous n'avons pas trouvé de modifications des membranes cytoplasmiques. Ceci ne va nullement à l'encontre de l'hypothèse proposée d'une part par STRAUSS et par PAPPENHEIMER d'autre part. Une modification dans les propriétés chimiques de la membrane cellulaire peut fort bien ne pas s'accompagner de modifications morphologiques.

- Par contre, nous avons noté des modifications très précoces des mitochondries, moins d'une heure après l'adjonction aux cultures cellulaires de toxine diphthérique.

Celles-ci contiennent des phospholipides et probablement de l'acide ribonucléique. Mais surtout, elles sont le siège d'enzymes d'une importance exceptionnelle. En effet, les mitochondries contiennent du cytochromoxydase et de la succinodeshydrogénase qui seraient localisées dans la membrane mitochondriale.

On y trouve également les nombreuses enzymes qui entrent en jeu dans le cycle de KREBS (par exemple fumarase, aconitase, isocitricdehydrogénase)!

Ainsi, les mitochondries sont-elles capables, lorsqu'on leur fournit les éléments qui leur manquent ou qu'elles possèdent en quantité insuffisante, tels que les éléments du cycle tricarboxylique, cytochrome c, ions Mg^{++} , les mitochondries sont-elles capables d'effectuer les opérations de la phosphorylation oxydative.

Cette phosphorylation oxydative, qui permet la transformation de l'adénosine diphosphorique en adénosine triphosphoré, serait seulement réalisable lorsque les mitochondries conservent leur forme normale; en devenant sphériques, elles perdraient cette activité phosphorylative avant celle d'oxydation.

Ainsi, ont-elles une importance fondamentale dans les phénomènes d'oxydation cellulaire. CHANN, en 1955, a pu identifier dans leur constitution la présence des cytochromes a, a3, c, e, b, b5, 3 flavoprotéine, une diphosphopyridine-nucléotide et une catalase.

Connaissent la composition des mitochondries, leur rôle enzymatique et les résultats des expériences de STRAUSS et de PAPPENHEIMER, il ne paraît donc pas étonnant qu'en microscopie électronique, nous ayons trouvé, ainsi que cela s'est produit, des lésions mitochondriales.

Le problème qui se pose alors est de savoir si ces lésions sont primitives, avec destruction des mitochondries par la toxine et dégénérescence secondaire de la cellule, ou si, en premier lieu, les mitochondries dégèrent, la cellule s'altérant ensuite.

La première hypothèse paraît bien peu plausible. En effet, il ne paraît pas possible que la toxine puisse entrer aussi rapidement dans la cellule et vienne détruire les mitochondries. Si, d'autre part, elle pénétrait aussi rapidement, il semble qu'on obtiendrait une lésion de toutes les mitochondries en même temps et non des atteintes d'abord fragmentaires. Enfin, si la toxine pénétrait vraiment dans la cellule, on ne retrouverait pas au bout de vingt-quatre heures des mitochondries encore normales.

D'autre part, les expériences des cellules lavées de PAPPENHEIMER en dehors de toute considération sur le poids moléculaire de la toxine, paraissent assez probantes pour affirmer que la toxine n'entre pas dans la cellule.

Enfin, la précocité des lésions vues au microscope électronique plaide contre l'hypothèse d'une absorption de la toxine par les cellules car elles sont alors beaucoup trop rapides pour être dues à une action directe de la toxine diphtérique, qui, si elles pénètrent dans la cellule, pénètrent, du seul fait des lois physiques, beaucoup plus lentement.

Il paraît plus probable, en effet, que la toxine agit effectivement sur la membrane cellulaire d'abord. Et ce blocage de la perméabilité membraneuse expliquerait les lésions mitochondriales.

Mais ces altérations des mitochondries peuvent s'expliquer elles-mêmes de plusieurs façons : certes, on sait que ce sont, dans les cellules, des éléments éminemment fragiles puisqu'elles servent même de test, lors des fixations des tissus pour l'examen au microscope électronique.

Plusieurs hypothèses peuvent donc être posées :

- les lésions des mitochondries sont dues à un hyperfonctionnement ; en effet, puisqu'elles jouent un rôle très important dans les phénomènes de phosphorylation, on peut supposer que les modifications apportées dans la perméabilité de la membrane cellulaire les oblige à un surcroît de travail pour essayer de pallier à ce trouble, surcroît de travail dont témoignerait leur hypertrophie et pourrait expliquer que chimiquement les troubles soient un peu plus tardifs que ne le montre l'examen en microscopie électronique.

Cet hyperfonctionnement aboutirait rapidement à la destruction des mitochondries.

Cependant, il est gênant dans ce cas de constater que les modifications d'ordre chimique sont manifestes au bout de quelques heures que, les lésions mitochondriales sont encore relativement modérées, bien que fort nettes.

Faut-il alors penser que toutes les mitochondries n'entrent pas en jeu en même temps et que leur très grand nombre dans une cellule explique que certains puissent rester longtemps dans un état de fonctionnement normal ?.-

Mais une deuxième hypothèse peut être avancée : étant donné que les parois des mitochondries contiennent en grande quantité des cytochromes et de la succinodéhydrogénase et que les lésions histologiques sont notées de façon très précoce, ne faut-il

pas voir dans ces lésions le témoin d'une action de la toxine sur les phénomènes d'oxydoréduction ? Cette hypothèse confirmerait les travaux de PAPPENHEIMER sur le cecropia, confirmés par ses déductions de chimie marquée. Mais, dans ce cas, il nous paraît que si les mitochondries étaient tellement sensibles, on devrait voir des lésions précoces sur toutes les mitochondries, ce qui n'est pas le cas, loin de là, dans les premières heures.

Cependant, les biochimistes paraissent penser qu'une atteinte de la membrane des mitochondries modifie très rapidement les phénomènes de phosphorylation. Nous avons noté que très tôt la paroi de la mitochondrie s'épaississait, qu'il devenait difficile de dissocier les deux feuilletts. Or, les expériences de PAPPENHEIMER ont mis en lumière les troubles apportés par la toxine diphtérique dans la voie de formation de l'adénosine triphosphorique. Il ne pourrait donc s'agir là d'un hyperfonctionnement de la mitochondrie, mais bien d'un ralentissement de ses fonctions.

Enfin, ne peut-on pas penser, sur le vu de lésions mitochondriales très précoces, que la lésion primitive est bien localisée à la membrane, mais que ces troubles de métabolisme observés sont dus à ces altérations des mitochondries, elles-mêmes secondaires à une lésion déterminée de la membrane et qui ne serait pas une modification de sa perméabilité ?

En effet, s'il existait un trouble de la perméabilité aussi important pour lyser si rapidement la cellule, pourrait-il être réversible au bout de deux heures, sous l'effet de l'antitoxine ?

Quelle que soit l'hypothèse avancée, les lésions que nous avons notées au microscope électronique en accord avec des expériences chimiques indiscutables, peuvent même renforcer la valeur de celles-ci, et nous pensons qu'il est indéniable, en tout cas, que les mitochondries jouent un rôle essentiel dans les troubles observés, qu'elles sont le siège de modifications qui permettent d'expliquer les altérations observées. Ce rôle dans la phosphorylation, dans le transport d'électrons est tel que, dès que les mitochondries sont altérées, il s'ensuit de graves désordres métaboliques et l'altération prévue visible en microscopie électronique paraît devoir faire mettre sur elles les modifications notées par les biochimistes.

En tout état de cause, il paraît bien, comme le pensent PAPPENHEIMER et STRAUSS, que la toxine ne pénètre pas dans la cellule. Et la plus ou moins grande quantité de mitochondries cellulaires pourrait expliquer que certaines cellules soient plus lentes que

d'autres à réagir à une agression en surface par la toxine diphtérique.

Mais un point reste obscur : pourquoi les cellules amniotiques restent insensibles à la toxine diphtérique ? Pour quelle raison la toxine n'agirait pas sur leur surface ? Nous ne pouvons y répondre.

L'interprétation de l'action antimittotique de la toxine diphtérique est plus aisée à faire :

Un très grand nombre de corps physiques ou chimiques parviennent à modifier les facultés de mitose des cellules.

La toxine paraît être un de ceux-ci et son action antimétabolique considérable semble suffire à expliquer ce ralentissement des mitoses.

Nous avons noté que les cellules témoins avaient également vu leurs mitoses diminuées de nombre. Il est possible que le milieu de culture qui les baignait soit devenu appauvri en raison de la nappe quasi-continue des cellules qui croissaient sur la lamelle et qu'un apport suffisant de substances nutritives a fait un peu diminuer le taux de croissance.

C'est un reproche que l'on ne peut faire en ce qui concerne les cellules intoxiquées dont le ralentissement mitotique a été beaucoup plus considérable car un grand nombre de cellules dégénérées s'étaient déjà décollées de la paroi et nous étions loin d'avoir une nappe cellulaire continue sur les lamelles.

En tout cas, il est indéniable que la toxine à la dose de 1 Lf/cc. ait une action antimittotique considérable car il n'y avait pratiquement plus de mitose au bout de vingt-quatre heures.

Que cet arrêt ou ce ralentissement des mitoses soit d'origine métabolique paraît très vraisemblable puisque c'est environ au bout de trois heures que ce phénomène paraît s'amorcer, délai nécessaire pour noter l'apparition des modifications dans l'incorporation de la méthionine et des autres facteurs nécessaires à la croissance des cellules.

APPLICATIONS PRATIQUES

Au terme de cette étude sur l'action de la toxine diphtérique en culture cellulaire que nous avons menée parallèlement avec les méthodes déjà classiques, on peut tirer quelques conclusions valables sur le plan pratique :

- LE TITRAGE

Le titrage d'une toxine diphtérique par la méthode des cultures cellulaires nous a paru beaucoup moins sensible que la méthode qui consiste à inoculer la toxine sous la peau du lapin. En effet, les cellules que nous avons utilisées nous ont donné des réponses positives pour des doses de toxine de l'ordre de 10^{-3} (KB) à $5 \cdot 10^{-4}$ 1 lf/cc (foie humain). Certes, LENNOX et KAPLAN ont pu obtenir de meilleurs résultats (10^{-5} lf/cc.) avec leurs cellules de rein de singe et de rein de lapin.

Il n'en demeure pas moins qu'avec l'inoculation intradermique au lapin, nous avons obtenu des réactions cutanées visibles avec des doses de toxine de l'ordre de 10^{-6} lf/cc. soit une dose mille fois moindre que celle nécessaire pour avoir une dégénérescence des cellules KB.

D'autre part, nous l'avons signalé, nous avons eu d'assez grosses difficultés pour noter l'effet cytopathogène de faibles doses de toxine tout au moins au bout de vingt-quatre heures, et pour une méthode de titrage, c'est précisément pour les faibles concentrations qu'il est important d'avoir une méthode sensible, les réactions de la peau du lapin nous paraissent beaucoup plus faciles à lire et beaucoup plus régulières dans leurs résultats.

- LA DÉTECTION D'UNE SOUCHE TOXINOGENE

La culture des cellules ne nous a pas paru très favorable à la détection de souche toxigène. Certes, ANDRE, à l'institut Pasteur de Saïgon a publié des résultats très intéressants en 1959 sur la détection des bacilles diphtériques toxigènes en inoculant sur des cellules en culture un liquide de prélèvement de gorge. Cette méthode lui aurait apporté des résultats rapides, et, dans l'ensemble, cohérents.



Il nous paraît cependant que cette méthode est difficilement applicable en laboratoire courant : en effet, il faut avoir des tubes de culture cellulaire prêts à être inoculés, ce qui demande tout de même de nombreuses manipulations ; il faut, d'autre part, des délais assez importants, semble-t-il, si la souche n'est pas très toxogène si l'on se réfère à la quantité de toxine nécessaire pour provoquer une dégénérescence cellulaire. Enfin, on ne peut être nullement assuré, quand on a fait un prélèvement de gorge, que le malade suspect de diphtérie n'est pas porteur d'un virus latent dont la mise en culture en même temps que le bacille diphtérique provoquera la dégénérescence cellulaire que l'on aurait pu mettre sur le compte du bacille diphtérique.

- Les autres techniques de détection d'une toxine diphtérique comme la méthode d'OUCHTERLONY, si elles sont très intéressantes dans un laboratoire de recherches, ne sont nullement adaptées au laboratoire non spécialisé.

Il s'agit, en effet, d'une technique qu'OUCHTERLONY a décrite en 1949 afin d'étudier la diffusion d'un antigène en milieu gélifié, ce qui permet notamment de juger de sa pureté. Pour ce faire, il suffit de couler dans une boîte de Pétri de la gélose, dans laquelle on creuse un certain nombre de trous.

Si, dans l'un d'eux, on place de la toxine diphtérique et dans l'autre de l'antitoxine, ces deux corps vont diffuser dans la gélose et on verra, au bout de quelques jours, se manifester une ligne de floculation témoin de la rencontre de ces deux substances au sein de la gélose.

On peut adapter cette technique à la recherche d'une toxine sécrétée par une souche de bacilles diphtériques. Dans ce cas, sur la gélose dans laquelle on aura laissé pendant quelques jours diffuser de l'antitoxine diphtérique, on peut mettre à cultiver le bacille diphtérique que l'on veut étudier. Et lorsque la culture se sera développée, que la toxine aura été sécrétée et aura diffusé, on verra de la même façon apparaître les images linéaires ou en halo de la floculation antigène-anticorps autour des colonies.

Cette technique simple n'est, en fait, pas bien adaptée au laboratoire clinique puisqu'elle demande des délais assez longs pour que la quantité de toxine produite puisse réagir avec l'anticorps, en sorte qu'en aucun cas elle ne peut être une méthode de diagnostic rapide d'une angine à fausses membranes. Il n'en demeure pas moins que sa sensibilité en fait, pour le laboratoire de recherche

pure, une technique très précieuse qui a trouvé de nombreuses applications dans les travaux d'immunologie; non seulement, elle permet de mettre en évidence un antigène, mais bien plus, selon la taille, le siège d'une ou de plusieurs lignes de précipitation sur la gélose, elle permet d'identifier dans un mélange donné la présence de plusieurs antigènes entrés en contact avec l'antitoxine. Mais là encore, les délais sont longs, de l'ordre de plusieurs jours.

- Et, en fin de compte, il nous paraît que pour un laboratoire non spécialisé, tel qu'un laboratoire d'hôpital ou d'analyses, l'inoculation d'une culture de bacilles au cobaye reste la méthode la plus simple, la plus facile à employer. Le cobaye est un animal extrêmement sensible à la toxine diphtérique, qui meurt assez rapidement en cas de diphtérie et dont l'autopsie montre parfois sans secours du microscope optique les lésions de surrénalité hémorragique quand la surrénale apparaît rouge cerise macroscopiquement.

Pour un laboratoire spécialisé, qui a besoin fréquemment de titrage, l'inoculation à la peau du lapin blanc apparaît la méthode de choix la plus simple, la plus rapide, la plus fidèle.

CONCLUSIONS

Il n'en demeure pas moins que les cultures cellulaires ont apporté des renseignements considérables sur le mode d'action de la toxine diphtérique et se sont révélées comme un système d'étude extrêmement précieux. En effet, on a, en cultures cellulaires, des cellules qui sont toutes identiques morphologiquement.

Elles ont montré qu'il existait malgré tout des différences dans le degré de leur sensibilité à la toxine diphtérique, différence non seulement entre plusieurs types de cellules, ce qui ne saurait surprendre, car on connaissait déjà cette différence allant jusqu'à la résistance des tissus de la souris, mais ce qui fut plus étonnant, différence de sensibilité de cellules d'un même type, que nous avons essayé d'interpréter grâce au microscope électronique, et peut-être en rapport avec leur plus ou moins grand nombre de mitochondries. Cependant, d'autres mécanismes peuvent être en cause, notamment le nombre de chromosomes de ces cellules cultivées depuis longtemps et qui ont pu donner naissance à des clones différents, ce que l'on connaît bien depuis les recherches effectuées par le Professeur TURPIN sur les aberrations chromosomiques à partir de cultures de fibroblastes.

Mais, surtout, les cultures cellulaires ont permis de faire progresser nos connaissances sur le mode d'action biochimique de la toxine. Certes, tous les problèmes ne sont pas encore résolus, il reste encore des hypothèses à confirmer, des obscurités à éclaircir.

Les expériences de PAPPENHEIMER sur le cecropia avaient l'avantage, grâce à un animal tout à fait particulier, d'apporter une explication intéressante de l'action de la toxine.

Ses travaux et ceux de Norman STRAUSS sur les cultures cellulaires paraissent cependant beaucoup plus probants. La chimie des éléments marqués a trouvé là un domaine d'investigation considérable et a permis de parer plus avant les modifications métaboliques provoquées par la toxine.

La visualisation en microscopie électronique de la cellule a un autre objectif que la chimie et ne permet pas de confirmer ou d'infirmer un désordre métabolique. Mais elle permet de voir des modifications morphologiques quand elles existent. Certes, des modifications biochimiques peuvent ne s'accompagner d'aucune altération du parenchyme cellulaire. C'est ainsi que si la membrane cellulaire nous a paru respectée, rien ne prouve qu'elle a gardé une perméabilité intacte.

Par contre, le microscope électronique a permis de découvrir les lésions qui peuvent expliquer les troubles observés en chimie. Il permet également, en accord avec les travaux du biochimiste, de visualiser le fonctionnement ou le dysfonctionnement d'un organisme, en l'occurrence les mitochondries, et de confirmer le rôle considérable qu'ont ces constituants cellulaires dans le métabolisme cellulaire.

Et il paraît intéressant que deux voies aussi différentes que celle de la chimie et de la physique puissent arriver aux mêmes conclusions, conclusions qui se trouvent venir renforcer considérablement ce qui était hypothèse.

VU et PERMIS d'IMPRIMER :

Le RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS,

J. SARRAILH

Le DOYEN de la FACULTE de MEDECINE
de PARIS :

Le PRESIDENT de la THESE :

L. BINET

R. TURPIN

BIBLIOGRAPHIE

1.- ANDRÉ AUDEBARD, et CHAMBON

Diagnostic de la diphtérie sur culture de tissus.
Annales de l'I.P. n° 2, p. 179-188. 1959

2.- BRACHET

Biochemical cytology

3.- MESSORE, CORACO

Action de la toxine diphtérique sur des types variés
de cellules en culture in vitro.
Reviste dell'istituto Scaoterapice italiano
vol. 32 , n°6, nov-Déc. 1957;

4.- DUBOS

Biochemical disturbance produced by infection

5.- FREEMAN

Bacteriophage infected streins of corynebacteries
diphterise
Journ. of Bacteriology , vol. 61, n° 6, Juin 1951.

6.- GREEN D.E. and Y.HATEFI

Mitochondrion and biochemical machines
Sciences, Vol. 133, n° 3445.

7.- JERNE N.K.

Acta pathol. Microbiol scend. 1951, suppl. 87
A study of avidity.

8.- Iwao KATO et PAPPENHEIMER

Effet précoce de la toxine diphtérique sur le métabolisme des cellules de mammifères en culture de tissus.
Journ. of Exp. Med. Août 1960, vol. 112, n° 2.

9.- LENNOX et KAPLAN

Action de la toxine diphtérique sur les cellules cultivées in vitro/
Proceed of the Society for Exp. biology and medecine 1957

- 10.- LEJEUNE J., CAUTIER M. et TURPIN R.
Les chromosomes humains en culture de tissus.
C.R.A. Sciences 248, 602, 1959.
- 11.- LEVADITI et MUTERMILCH
Sérothérapie anti-diphtérique préventive et curative
de la culture de cellules à l'état de vie pro-
longée in vitro.
Société de biologie 15/III/1913.
- 12.- LEVADITI et MUTERMILCH
Action de la toxine diphtérique sur la survie des
cellules in vitro.
Société de biologie 22/II/1913.
- 13.- PAPPENHEIMER
Pathogenesis of diphtheria in mechanisms of microbial
pathogenicity
- 14.- RELYVELD E.H. et BEN EFRAIN
La toxine diphtérique .
Annales de l'Institut Pasteur, Tome 97, p. 697-717
- 15.- RAYNAUD M. et RELYVELD E.M.
La réaction toxine - Antitoxine diphtérique
Annales de l'Institut Pasteur, tome 97, p. 636-678
- 16.- STRAUSS and HENDEE
Effets de la toxine diphtérique sur le métabolisme
des cellules Hela
Journ. of Exp. Med. Vol. 109, Févr. 59, n° 2.
- 17.- STRAUSS N.
Effets de la toxine diphtérique sur le métabolisme
des cellules Meta.
Journ. of Exp. Med. Vol 112 - Août 1960 N°2
-

